

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



EVALUACIÓN DE PRUEBAS PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI

*Trypanosoma cruzi*

MELANIE VERENA GRAMAJO LÓPEZ

EUGENIA RAQUEL GONZÁLEZ ALDANA

QUÍMICAS BIÓLOGAS

GUATEMALA, ABRIL 2015

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



EVALUACIÓN DE PRUEBAS PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI

*Trypanosoma cruzi*

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN

**PRESENTADO POR**

MELANIE VERENA GRAMAJO LÓPEZ

EUGENIA RAQUEL GONZÁLEZ ALDANA

**PARA OPTAR AL TÍTULO DE**

QUÍMICAS BIÓLOGAS

GUATEMALA, ABRIL 2015

## **JUNTA DIRECTIVA**

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
Licda. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza, M.A.	Secretaria
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Br. Michael Javier Mó Leal	Vocal IV
Br. Blanqui Eunice Flores de León	Vocal V

## AGRADECIMIENTOS

### A DIOS

Por brindarnos salud, fortaleza y sabiduría para lograr culminar otra etapa a nivel profesional.

### A NUESTROS PADRES

Por su amor, apoyo, consejos, por todos los valores que forjaron en nosotras, pero sobre todo por ser un ejemplo de perseverancia para luchar por cada meta propuesta.

### A LA UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA, EN ESPECIAL A LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

Por abrirnos las puertas al conocimiento y forjar nuestra formación académica, brindándonos las bases necesarias para iniciar nuestra vida profesional.

### A MSc. VIVIAN MATTA, Licda. KARLA LANGE, M.A. MARÍA EUGENIA PAREDES y Dr. JORGE LUIS DE LEÓN ARANA

Por brindarnos la asesoría y orientación durante el desarrollo de esta investigación.

### AL DEPARTAMENTO DE CITOHILOGÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

Por permitirnos el ingreso a sus instalaciones y proporcionarnos el material necesario para efectuar nuestra investigación.

### A LA EMPRESA NOVATEC

POR LA DONACION DE LAS PRUEBAS ELISA E INMUNO BLOT NOVATEC PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgG anti *T. cruzi*, QUE PERMITIERON LA REALIZACIÓN DE ESTA INVESTIGACIÓN.

## **DEDICATORIA**

### **A DIOS**

Por darnos la vida, la sabiduría y la fortaleza para luchar por nuestros ideales. Por guiarnos por el buen camino y permitirnos alcanzar nuestras metas.

### **A NUESTROS PADRES**

Por creer en nosotras y apoyarnos en cada proceso de nuestra vida, por forjarnos con principios y valores que han facilitado nuestro desarrollo como profesionales. Por cada palabra de aliento en los momentos difíciles y por festejar cada logro que hemos obtenido. Pero, principalmente por ser las bases que nos ayudaron a llegar hasta aquí y enseñarnos que si caemos debemos levantarnos y luchar por nuestras metas. Ellos son quienes nos dieron grandes enseñanzas y los principales protagonistas de este sueño alcanzado.

### **A NUESTRAS HERMANAS**

A cada una de ellas, por su apoyo, consejos, cariño y por cada momento de la vida en los que han intervenido para proporcionarnos la ayuda necesaria.

## ÍNDICE

	Página
I. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN	8
II. ANTECEDENTES	9
A. Agente Causal	9
1. Características	9
a. Morfología	9
b. Taxonomía	11
c. Ciclo evolutivo	12
2. Vías de transmisión	12
a. Vectorial	12
b. Transfusional	14
c. Congénita	15
d. Otras formas	17
B. Generalidades de la enfermedad de Chagas	17
1. Datos históricos	18
2. Distribución geográfica	19
3. Epidemiología en Guatemala	21
C. Fisiopatología	23
D. Etapas de la Infección	24
a. Fase Aguda	24
b. Fase indeterminada	25
c. Fase crónica	26
E. Tratamiento	26
1. Fase Aguda	27
2. Fase indeterminada	29
3. Fase Crónica	29
F. Pronóstico	29
G. Profilaxis	29
H. Diagnóstico	30
1. Métodos Directos	30
a. Gota Gruesa	30
b. Microhematocrito	31
c. Frote sanguíneo	31

d. Técnica de microStrout	31
e. Método de Hoff	31
h. Reacción en cadena de la polimerasa	32
2. Métodos Indirectos	32
a. Xenodiagnóstico	32
b. Hemocultivo	33
c. Ensayo Inmunoenzimático ELISA	33
d. Inmunoblot	35
e. Hemoaglutinación indirecta	36
f. Inmunofluorescencia indirecta	37
g. Reacción de fijación de complemento	37
I. Concordancia entre Pruebas	38
III. JUSTIFICACIÓN	39
IV. OBJETIVOS	40
V. MATERIALES Y MÉTODOS	41
A. Universo de trabajo	41
B. Muestra	41
C. Recursos	41
1. Recursos humanos	41
2. Recursos institucionales	41
3. Recursos materiales	41
D. Procedimientos	41
F. Diseño Estadístico	44
1. Tipo de estudio	44
2. Diseño de muestreo	44
3. Análisis de resultados	44
VI. RESULTADOS	45
VII. DISCUSION DE RESULTADOS	51
VIII. CONCLUSIONES	55
IX. RECOMENDACIONES	56
X. REFERENCIAS	57

## I. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

En Guatemala se han realizado varios estudios sobre la transmisión de la enfermedad de Chagas, con el propósito de disminuir la tasa de incidencia, erradicar los vectores y las situaciones de riesgo que contribuyen su transmisión.

La Unidad de Inmunodiagnóstico LAMIR y la Unidad de investigación Inmunopatología de Enfermedades Tropicales realizan investigaciones sobre la enfermedad de Chagas, siendo el área de diagnóstico la de mayor interés. Es por ello que se requiere de pruebas diagnósticas que les permitan detectar los casos que se presenten de manera temprana, para así proporcionar resultados que evidencien el estado de salud real de la población.

Es por ello que en este estudio se evaluarán dos pruebas para la detección de anticuerpos IgG anti *T. cruzi*, el primero basado en el principio de ELISA y el segundo un Immunoblot, los que serán comparados para determinar su sensibilidad, especificidad para así establecer su utilidad en el diagnóstico de esta enfermedad.



## II. ANTECEDENTES

La enfermedad de Chagas es una zoonosis causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*. Este protozoo flagelado se transmite normalmente al humano y a otros mamíferos, por la picadura de una chinche que pertenece a la familia *Reduviidae* pudiendo ser de varios géneros, entre ellos *Triatoma* y *Rhodnius* (Monroy, Rodas, Mejía, Rosales, Tabaru, 2003).

Es una zoonosis muy compleja, que está presente en todo el territorio de Sudamérica, Centroamérica y México y que continúa representando una grave amenaza para la salud humana en los países de esta vasta región. Existen diferentes cepas aisladas, que corresponden a diversos genotipos de *T. cruzi* y que infectan a 150 especies pertenecientes a 24 familias de la fauna doméstica y silvestre (Guhl, 2009).

La enfermedad presenta factores de riesgos epidemiológicos asociados con la pobreza y con las malas condiciones de vivienda, principalmente en las áreas rurales de toda la zona latinoamericana. La Organización Mundial de la Salud reportó en el 2002, de 16 a 18 millones de personas infectadas por el parásito, 300,000 casos nuevos por año y 21,000 muertes por año principalmente en niños (OPS/OMS, 2001).

### A. Agente causal

#### 1. Características

Para conocer la forma en que actúa el *Trypanosoma cruzi* es importante conocer sus características morfológicas, su taxonomía y el ciclo evolutivo del parásito.

##### a. Morfología

La superficie celular de *T. cruzi* se compone de membrana celular, bicapa lipídica y una serie de carbohidratos asociados a la membrana hacia el medio extracelular, formando el glicocalix del parásito. Este glicocalix se compone de glicolípidos y glicoproteínas unidas que recubren la parte externa superficial de parásito.

Existen al menos tres macrodominios en la membrana entre estos están: la existencia del cuerpo celular, el flagelo, la bolsa paraflegelar. Unida a la superficie más interna se encuentra la capa formada por microtúbulos subpeliculares. Además de conectarse a la membrana, estos microtúbulos se han encontrado asociados con el retículo endoplasmático y algunas veces asociado a las rutas de absorción endocítica (Souza, 2008).

El 85% de la ruta endocítica ocurre a través del citostoma, una estructura redondeada, rodeada por microtúbulos subpeliculares, que se invagina profundamente y el resto de la vía endocítica ocurre en la bolsa flagelar. Las moléculas a ser endocitadas por el parásito inicialmente se unen al *citostomo*, y luego son internalizadas en el fondo del *citoprandix*, apareciendo en el citoplasma celular como pequeñas vesículas endocíticas que posteriormente se fusionan entre sí y generan estructuras tubulares que pueden observarse en la zona central del parásito. Más tarde las macromoléculas endocitadas son concentradas en estructuras denominadas *reservosomas*.

Cada epimastigote presenta varios reservosomas localizados en la región posterior de la célula, su forma puede variar de acuerdo a las condiciones de crecimiento del parásito, pero puede decirse que en general presentan forma esférica, están rodeados por una única membrana y que poseen un diámetro aproximado de 0.7  $\mu\text{m}$ . Los reservosomas son organelas de reserva, que contienen lípidos y proteínas que son utilizados por el parásito cuando se encuentra creciendo en un medio escaso de nutrientes. Una característica importante de los reservosomas es que acumulan grandes cantidades de cruzipaina, que es la cisteína proteinasa principal presente en *T. cruzi* (Landfear. Ignatushchenko, 2001).

La vía secretora, por su parte está formado por el retículo endoplasmático, aparato de Golgi y un sistema de vesículas liberadas desde este último, que rodea a la bolsa paraflagelar. El flagelo se compone de la estructura típica de nueve tripletes de microtúbulos periféricos y un par de microtúbulos centrales. Ligado al inicio de este flagelo existe una estructura conocida como el cuerpo paraflagelar formado por un gran número de proteínas, siendo mayoritarias las conocidas como las "Barra de proteínas paraflagelares 1 y 2" las cuales son altamente antigénicas. La longitud del flagelo varía según el estadio, pudiendo poseer desde 20  $\mu\text{m}$  en el caso de los trypomastigotes o reducirse a 1  $\mu\text{m}$  en los amastigotes intracelulares. La base del flagelo se localiza próxima al cuerpo basal, y por lo tanto del comienzo del flagelo, existiendo estructuras filamentosas que unen dicho cuerpo basal con el kinetosoma. En el caso de *T. cruzi* el flagelo emerge lateralmente, creando un movimiento aparente en el cuerpo del parásito, dando la sensación de una membrana ondulante (Souza, 2008).

El *T. cruzi* es un protozoo capaz de vivir y multiplicarse en el interior de varios tejidos de mamíferos, a través de sus formas amastigotas y de circular en la sangre de los animales en forma de tripomastigote. El *T. cruzi* difiere de otros tripanosomas en que posee una fase intracelular, que involucra además del sistema linfocito-macrófago, células del miocardio, glándulas endocrinas y células gliales del cerebro. En esta fase, el parásito es un amastigote típico de forma leishmaniásica ovoide de una a cinco micras de diámetro longitudinal, con un núcleo grande y cinetoplasto, compuesto de cuerpo basal y un blefaroplasto

(pequeño corpúsculo intracelular situado por lo general cerca de la membrana que da origen a un flagelo y rige su movimiento) (Souza, 2008).

En las células tiene la forma redondeada, sin flagelo, el amastigote localizándose de preferencia en el tejido nervioso y músculos, en especial en el miocardio. La célula afectada, por la activa reproducción binaria del parásito, adquiere una forma quística. Cuando el tripanosoma completa su evolución endocelular, en 4 a 5 días, abandona el endoquiste y parasita a otra célula vecina o pasa al torrente para anidarse en tejidos distintos. En el paso de amastigote a tripomastigote se encuentran formas de epimastigote (Landfear, Ignatushchenko, 2001).

### **b. Taxonomía**

De acuerdo a sus características morfológicas el *T. cruzi* recibe la siguiente clasificación sistemática.

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

Dentro de la familia Trypanosomatidae, el género Tripanosoma es uno de los mas importante debido a que incluye especies que ocasionan enfermedades en humanos, como *T. cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, así como *T. gambiensi* y *T. rhodesiense*, agentes causales de la enfermedad del sueño y especies patógenas en animales, como *T. brucei*, *T. equiperdum* y *T. equinum* (Guhl, 2009).

En función del comportamiento del parásito, principalmente en el vector, el género se ha dividido en dos grupos. El primero llamado Stercoraria, el cual 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 se incluyen a *T. cruzi* y *T. lewisi*. El segundo grupo llamado Salivaría, 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* (Monroy, Rodas, Mejía, Rosales, Tabaru, 2003).

### c. Ciclo evolutivo

*T. cruzi* es un parásito unicelular que altera su vida entre dos hospederos, un invertebrado y un vertebrado, presentando un ciclo de vida di genético. A lo largo de su ciclo evolutivo sufren profundas alteraciones que reflejan su adaptación al medio en que se localiza. Esas formas reciben nombre 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) (Salazar, Marin, 2006).

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

- *Amastigote*: (20- 40 x 2 $\mu$ m) Posee un aspecto fusiforme con flagelos anteriores al núcleo. Se localiza en los tejidos (miocardio, esófago, colon, neuroglia y sistema retículo endotelial) del huésped vertebrado. Se divide por fisión binaria.
- *Epimastigote*: (2- 4  $\mu$ m) Posee una forma esférica u ovalada, carece de flagelo libre; estadio de localización intracelular y replicativo en el mamífero, formando estructuras denominados nidos. Se observan en el aparato digestivo del vector y en medios de cultivo específicos. Se divide por fisión binaria.
- *Tripomastigote*: (20- 25 $\mu$ m). Posee una forma elongada con el citoplasma situado atrás del núcleo, el flagelo libre, membrana ondulante de importante extensión. Este estadio se encuentra presente en la circulación del mamífero y en la ampolla rectal en el vector. Es la forma infectante (metacíclica) y también la forma hemática sanguínea.
- *Esferomastigote*: Es una forma de transición frecuente entre las fases de amastigote y tripomastigote, particularmente en el intestino del vector.

## 2. Vías de transmisión

### a. Vectorial

La forma más frecuente de contraer la enfermedad es por el contacto con las deyecciones infectantes de las chinches hematófagas pertenecientes a la familia *Reduviidae*, dentro de la cual constituyen una subfamilia especial, *Triatominae* de la cual se conocen alrededor de cien especies. En Guatemala, *Triatoma dimidiata* es de amplia distribución, mientras *Rhodnius prolixus* y *Triatoma nitida* solamente en zonas restringidas. La infección no suele transmitirse a las personas a través de la picadura del insecto,

sino a través de las deyecciones infectantes de las chinches hematófagas debido a que el parásito está presente en las heces del insecto y penetra al organismo a través de la piel (Monroy, Rodas, Mejía, Rosales, Tabaru, 2003).

Usualmente, el insecto infectado deposita heces en la piel al mismo tiempo que se está alimentando de la sangre humana, dado a que el insecto es fotosensible tiende a alimentarse mientras la persona duerme. La persona a menudo frota la picadura, favoreciendo la introducción accidental de las heces en la herida de la picadura, en un corte abierto, en los ojos o boca. Por lo general, estos insectos triatomíneos viven en las grietas y huecos de las casas mal construidas en las zonas rurales y suburbanas. Normalmente permanecen ocultos durante el día y por la noche entran en actividad alimentándose de sangre humana.

En general, pican en una zona expuesta de la piel, como la cara, y defecan cerca de la picadura. Los parásitos penetran en el organismo cuando la persona picada se frota instintivamente y empuja las heces hacia la picadura, los ojos, la boca o alguna lesión cutánea abierta. Las especies con mayor capacidad vectorial, con hábitos domiciliarios y con mayor distribución geográfica pertenecen a los géneros *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus* (Guhl, 2009).

El área chagásica en Guatemala está ubicada principalmente en los departamentos de Chiquimula, Zacapa, Jalapa, Santa Rosa, El Progreso, Alta Verapaz, Baja Verapaz, Quiché y Huehuetenango, sin embargo los principales vectores de la enfermedad se encuentran presentes en 21 de los 22 departamentos, con excepción de Totonicapán, lo que hace posible la transmisión en todo el país (Monroy, Rodas, Mejía, Rosales, Tabaru, 2003).

Existen tres tipos de ciclos de transmisión de *T. cruzi*. El ciclo doméstico perpetúa la infección en seres humanos. Se presenta principalmente en viviendas rurales o periurbanas de mala calidad, con paredes de bajareque o adobe y techos de material vegetal. Los principales reservorios del parásito son los seres humanos, perros y una gama enorme de animales peridomésticos, especialmente *Didelphis marsupiales* que desempeña un papel epidemiológico muy importante en la transmisión del parásito. Los insectos vectores domiciliados viven y se multiplican en grietas de las paredes, agujeros del techo, debajo y detrás de los muebles, de los cuadros y en los anexos peridomiciliarios tales como gallineros, pilas de leña y acúmulos de piedras o ladrillos. Es el caso de *Triatoma infestans*, principal vector domiciliado en los países del cono sur del continente y *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* en los países andinos y centroamericanos y *Triatoma barberi* en México.

En el ciclo selvático, a lo largo del continente americano se han descubierto más de 180 especies o subespecies de pequeños mamíferos silvestres, terrestres o arbóreos, pertenecientes a siete órdenes y 25 familias que son infectados de forma natural por *T. cruzi*. Intervienen triatominos selváticos que se infectan y que, a su vez, infectan a roedores, marsupiales y otros animales silvestres, tales como armadillos y muchas especies de roedores. Varias especies de triatominos conforman el ciclo silvestre de *T. cruzi*, tales como *Panstrongylus geniculatus*, *Rhodnius colombiensis*, *R. brethesi*, *R. robustus* y *R. pallescens*, entre otros (Abecerril, Pérez, Noguez, Palafox, 2010).

Por último, en el ciclo peridoméstico intervienen gran variedad de mamíferos como roedores, marsupiales y perros, que entran y salen libremente de las viviendas y triatomas selváticos atraídos hacia las casas por la luz y el alimento. Este ciclo sirve de nexo entre los ciclos doméstico y selvático. Estudios recientes en Centroamérica y en los países andinos han demostrado una enorme capacidad de desplazamiento de algunos insectos vectores, como *Triatoma dimidiata* en el peridomicilio de extensas regiones endémicas.

El ciclo doméstico es el que mantiene la infección en el área rural y periurbana. El vector se adapta bien a las viviendas de los humanos donde el humano y reservorios animales están en íntimo contacto. Ellos viven y se multiplican en las rajaduras de las paredes, techos, debajo de la cama, detrás de cuadros y cajas. Estos son transportados de casa en casa cuando las personas se movilizan (Guhl, 2009).

En 1996, con el apoyo de la Agencia de Cooperación Internacional del Japón JICA, se realizó el estudio de la distribución de vectores a nivel nacional, siendo Chiquimula el departamento con mayor número de chinches capturadas del total de casas examinadas, con la presencia de *R. prolixus* en alta densidad, sin embargo *T. dimidiata* fue más abundante en Jutiapa, Alta Verapaz y Santa Rosa. Así mismo de estas chinches el número de positivas para *T. cruzi* predominó en el departamento de Guatemala (50.0 %), seguido de Zacapa (33.3%), Santa Rosa (27.0%) y Chiquimula con un (21.0%) (Monroy, 1996).

#### b. Transfusional

La segunda vía de transmisión más común es a partir de transfusiones de sangre, la transmisión del parásito por transfusión de una unidad de sangre total de 500ml oscila entre el 12 y el 20%. La mayoría de los casos detectados por los bancos de sangre son de la fase crónica. La parasitemia en donantes asintomáticos, es baja e intermitente, por lo que la transfusión puede no transmitir la enfermedad si en el momento de la donación no hay parásitos en sangre. En la enfermedad de Chagas post-transfusional, el periodo de incubación es de 20-40 días, mayor que el transmitido vectorialmente (7-10 días). Ello ha sido

atribuido a la menor capacidad infectiva de los tripomastigotes circulantes respecto de los tripomastigotes metacíclicos eliminados por el vector (Salazar, Marin, 2006).

La infección por sangre y componentes sanguíneos depende de varios factores: el tipo y cantidad de componente transfundido, ya que el parásito debe permanecer viable durante el procesamiento y manipulación, y se trata de un parásito relativamente frágil, que puede ser transmitido por sangre total, concentrado de hematíes, plaquetas y leucocitos. La sangre total y las plaquetas parecen ser los componentes con mayor riesgo de transmisión. Puesto que en la actualidad apenas se utiliza sangre total, el componente hoy con mayor riesgo, son las plaquetas. La mayoría de los casos publicados en zonas no endémicas han sido por este componente. El hecho de que las unidades de plaquetas se conserven a 20-24° C, temperatura cercana a la utilizada para cultivar el parásito, puede explicar que el *T. cruzi* permanezca viable durante todo el periodo de conservación de este componente sanguíneo (hasta 7 días) (Blejer, Valle, 2002).

Se ha referido que el parásito podría vivir 2-3 semanas a temperaturas de refrigeración y congelación, pero se desconoce la supervivencia más allá de este periodo. Algunos autores creen que el parásito no resiste la congelación ya que el *T. cruzi* es una célula rodeada de una membrana celular, por lo que la formación de cristales de hielo durante la congelación puede causar su destrucción, de forma similar a lo que sucede con la congelación de hematíes. La irradiación no inactiva al parásito, no así la leucodepleción que disminuye el número de parásitos presentes aunque no evita la transmisión en su totalidad.

Para que ocurra transmisión de la enfermedad, el donante debe presentar parasitemia al momento de la donación y en la mayoría de los casos los niveles de parasitemia son bajos. Los tripanosomas son parásitos con tropismo esencialmente intracelular, y por tanto, normalmente no circulan libres por la sangre (Cedillos, Romero, Ramos, Sasagawa. 2011).

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 (Arrieta, Cañabate, Castro, Gascon, Madoz, 2009).

#### c. Congénita

La tercera vía de transmisión de importancia es de madre a hijo, ya que existe un riesgo de transmisión de la enfermedad a los hijos durante el embarazo, en el parto o durante la lactancia. La prevención de la transmisión vertical no se realiza durante el embarazo, ya que los medicamentos existentes son tóxicos y

teratógenos. Ocurre cuando *T. cruzi*, atraviesa las mucosas o penetra el epitelio trofoblástico. En el transcurso del embarazo, puede ocurrir infección transplacentaria provocada por la parasitemia materna y el feto desarrolla lesiones semejantes a la etapa crónica (Berganza, 2011).

La enfermedad fetal representa la forma congénita de esta parasitosis. 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. 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 periodo exento del riesgo. Queda por dilucidar por que no todos los hijos de madres chagásicas adquieren la infección, posiblemente como lo demuestran estudios experimentales, la cepa parasitaria será determinante (Moya, Moretti, 1997).

En la enfermedad de Chagas congénita 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.

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 posibilidad de que una embarazada esté en estadio agudo de la enfermedad incrementa el riesgo de transmisión (Abecerril, Pérez, Noguez, Palafox, 2010).

La enfermedad de Chagas congénita ha sido limitada a las zonas rurales; sin embargo, se notifica cada vez con mayor frecuencia en ciudades donde no hay transmisión vectorial, pero se atribuye a la migración desde el campo de numerosas mujeres infectadas en edad reproductiva. Se han notificado casos de



enfermedad de Chagas congénita en Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Guatemala, Honduras, Paraguay, Uruguay y Venezuela. En países no endémicos, principalmente en España, el riesgo de transmisión varía según la cepa de *T. cruzi*, la parasitemia de la madre, la existencia de lesiones en la placenta y la región geográfica; este riesgo de transmisión se ha estimado en un promedio de 5% (Guhl, Landins-Helds, 2007).

La OMS estima que en Latinoamérica existen 2 millones de mujeres en edad fértil infectadas por *T. cruzi*, lo que representa el 25% de la población infectada. La incidencia de transmisión congénita es del 0.133%, lo que representa por lo menos 14.385 casos/año (OPS/OMS, 2001).

#### d. Otras formas

La transmisión por trasplante de órganos de donadores infectados se ha reportado sobre todo, en casos de trasplante de riñón. Los trasplantes de corazón, médula ósea y páncreas de donantes vivos y muertos son también posibles causas de transmisión de la enfermedad de Chagas. Se han notificado casos en Argentina, Brasil, Chile y Venezuela (Guhl, 2009).

También puede ocurrir por transmisión accidental en técnicos, médicos, investigadores y en manipuladores de diferentes tipos de materiales contaminados como: excretas de triatomíneos, cultivos de parásitos y sangre infectada.

Se ha reportado la transmisión oral de la enfermedad de Chagas tras la ingestión de alimentos contaminados con triatomíneos infectados o excretas. La ingestión de carne cruda o sangre de animales infectados puede favorecer la entrada del parásito por las mucosas (Abecerril, Pérez, Noguez, Palafox, 2010).

### **B. Generalidades de la enfermedad de Chagas**

La existencia de la enfermedad depende de la presencia de un agente etiológico, un vector y del hospedero adecuado, el cual es representado por el hombre y por varios mamíferos domésticos y silvestres (Monroy, Rodas, Mejía, Rosales, Tabaru, 2003).

Es considerada la cuarta causa de mortalidad en América Latina, después de la malaria, esquistosomiasis y parasitosis intestinal, ya que ha provocando 43,000 muertes por año, causadas en su mayor parte por la cardiopatía que ocasiona el parásito cuando se anida en las fibras cardíacas. Se desarrolla como una

infección de por vida en humanos, quienes actúan como reservorios del parásito. Esta infección se caracteriza por presentar una corta fase aguda con alta parasitemia, que no suele ser diagnosticada en la mayoría de los casos, y una subsecuente fase crónica que es persistente. Debido al riesgo de infección congénita y/o transmisión horizontal por transfusión de sangre infectada, esta enfermedad se ha convertido en un gran problema en regiones no endémicas, sobre todo por el incremento en la migración de personas desde Centro y Sur América hacia países desarrollados. Se ha descrito también la forma indeterminada de la enfermedad, la cual es asintomática en todo el transcurso de la misma (Guhl, 2002).

En la década pasada, los programas de lucha contra la enfermedad puestos en marcha en varios países endémicos han proporcionado resultados fructíferos; algunos han logrado interrumpir la transmisión vectorial por *Triatoma infestans*, el principal vector domiciliado en la región del cono sur, como en Chile, Uruguay y Brasil; el resultado ha sido un descenso en la incidencia de la enfermedad de Chagas en América Latina. Sin embargo, los demás países del cono sur (Argentina, Bolivia, Paraguay y Uruguay), los países andinos (Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela), las Guyanas, todos los países centroamericanos y México todavía están implementando programas de control vectorial en diferentes grados de ejecución (Guhl, 2009).

### **1. Datos históricos**

En 1909 Carlos Ribeiro Justiniano Chagas publicó en Brasil un artículo conocido como “Nueva Tripanosomiasis Humana” en el cual describía una nueva enfermedad, su agente causal, la existencia de un vector invertebrado y la transmisión experimental a mamíferos. En años posteriores describió las formas crónicas de la enfermedad, incluyendo la forma cardíaca, gastrointestinal y las manifestaciones neurológicas; así como la infección congénita. La posibilidad de transmisión de la enfermedad a través de transfusión sanguínea fue descrita por Mazza en 1936 (Kropf, Massarani.1997).

En 1913 se describió el uso de la prueba de fijación del complemento para el diagnóstico, en 1914 el xenodiagnóstico y hasta 1970 se documentó el desarrollo de otras pruebas serológicas, como las técnicas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y hemaglutinación indirecta (HAI) (Moya, Moretti, 1997).

En Guatemala, la investigación sobre la enfermedad de Chagas inició en 1931 cuando el Profesor Dr. Édward Reichenow del Instituto de Medicina Tropical de la Universidad de Hamburgo, estudia las fincas cafetaleras de Santa Rosa y Escuintla. Identificó los primeros casos de la enfermedad en niños que vivían en la finca “Las Viñas”, ubicado en el departamento de Santa Rosa. Describió insectos reducidos que por sus características supuso se trataba de *Triatoma dimidiata*, en quienes encontró el 40% de infección con

*T. cruzi*. Sus estudios culminaron en el diagnóstico de los dos primeros casos de infección humana en el país, sin embargo, sus conclusiones no dieron la importancia merecida a la enfermedad, por lo que la investigación acerca de esta patología en nuestro país se retardó durante casi 15 años. Fue hasta 1947 que el Dr. Jorge Fernández estudió en el Hospital General San Juan de Dios el primer caso de cardiopatía chagásica con comprobación histológica, con lo que se reinició el estudio de dicha enfermedad (Aguilar, 1993).

En 1943 Blanco Salguero, Montenegro, De León y en 1959 Peñalver, realizaron estudios sobre la distribución de la Enfermedad de Chagas y sus vectores en Guatemala. Enfatizaron que la distribución de los insectos estaba fuertemente limitada a los departamentos del oriente del país. Sin embargo ninguno realizó estudios sobre la distribución de los vectores a lo largo del territorio (Blanco, 1943. Montenegro, 1943).

Pero en 1987 Schofield reportó que *Triatoma dimidiata* se distribuye desde el sur de México hasta Ecuador y *Rhodnius prolixus*, el segundo vector de importancia en el país habita desde el sur de México hasta Colombia y Venezuela (Schofield, 1987).

## **2. Distribución geográfica**

La enfermedad de Chagas es conocida como la tripanosomiasis del continente americano, habiéndose reportado casos humanos desde el sur de los Estados Unidos hasta la Patagonia en Argentina. La transmisión en humanos depende de varios factores, incluyendo la densidad de reservorios selváticos y domésticos, la densidad y rango de infección de los insectos triatominos y las condiciones de vida y vivienda de las personas. La población con mayor riesgo es aquella que vive en zonas no tropicales y en viviendas aptas para la proliferación del vector (Abecerril, Pérez, Noguez, Palafox, 2010).

Estudios realizados en Guatemala en 1959 enfatizaron que la distribución de los vectores se limita a los departamentos situados al este del país, sin embargo, no existían estudios que abarcaran la totalidad del territorio nacional. En 1999 Tabaru y colaboradores confirmaron que los vectores son encontrados con mayor frecuencia en el este del país, en departamentos como Chiquimula, Jalapa, Jutiapa, Santa Rosa, Zacapa, oeste del Quiché y norte de Alta Verapaz. La evaluación de los vectores en diferentes zonas muestran que se encuentran infectados con *T. cruzi* el 38.9% en Zacapa, 37.5% en Guatemala, 25.1% en Santa Rosa, 22.7% en Chiquimula, 8.2% en Jutiapa y 2.3% en Alta Verapaz. Este estudio estima que

aproximadamente 330,000 personas viven en el tipo de casa que presenta mayor riesgo en toda la república de Guatemala.

Los vectores de la enfermedad habitan en viviendas de regiones rurales construidas con materiales como palma, bajareque y barro, las cuales han sido relacionadas a condiciones de pobreza. De acuerdo al censo realizado en 1994 el 65% de la población guatemalteca vive en área rural, de ellos el 60% vive en casas construidas con paredes de barro las que presentan las características que permiten la supervivencia de los vectores (Monroy, Rodas, Mejía, Rosales, Tabaru, 2003).

El avance significativo del programa de control de la enfermedad de Chagas en Centroamérica, ha sido revisado por Ponce en el 2007, quien informa el progreso de la eliminación de *R. prolixus* en Guatemala, El Salvador, Honduras y Nicaragua, y señala la necesidad de desarrollar estrategias para la vigilancia y control del *T. dimidiata*. Así mismo, indica la importancia de conocer mejor la presencia y distribución de los triatominos emergentes: *Rhodnius pallescens* en Panamá y *T. nítida* y *T. ryckmani* en Guatemala (Cedillos, Romero, Ramos, Sasagawa, 2011).

Según los datos del Ministerio de salud Pública de la Republica de Guatemala, el índice de infestación domiciliaria por departamento durante el periodo del 2008-2010 es el siguiente:

Tabla No. 1 índice de infestación domiciliaria por departamento durante el periodo del 2008 al 2010

Departamento	2008	2009	2010
Alta Verapaz	2.6	05	1.14
Baja Verapaz	2.3	2.6	2.1
Chiquimula	1.6	0.0	1.5
El Progreso	0.2	0.6	0.4
Huehuetenango	1.1	0.6	0.9
Jalapa	4.0	4.2	2.6
Jutiapa	8.0	17.7	9.4
Quiche	0.9	0.9	0.8
Santa Rosa	1.2	3.1	2.0
Zacapa	0.2	0.3	0.4

FUENTE: Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. 2011

### 3. Epidemiología en Guatemala

En 1995, se realizó un estudio piloto de control vectorial, para evaluar la eficacia del rociamiento con insecticidas en la reducción de la infestación de *T. dimidiata* y *R. prolixus*. El estudio se desarrolló en las aldeas de Tituque, y Tuticopote, departamento de Chiquimula, Guatemala, La infección domiciliar se midió durante el periodo de marzo de 1995 a diciembre de 1998, en intervalos de 3-4 meses. El insecticida se aplicó una sola vez en el domicilio y peri-domicilio en noviembre de 1995, utilizando lambda y propoxur en Tituque, y Tuticopote respectivamente. En 1995, antes de la intervención, la tasa de infestación domiciliar con *T. dimidiata* y *R. prolixus* oscilaba entre 34-42% y 19-20% respectivamente en una muestra de casas. Tres meses después de la intervención, la infestación domiciliar con *T. dimidiata* y *R. prolixus* había disminuido a 8% y 4% respectivamente. Un año después había disminuido a 0% para *R. prolixus* mientras que había aumentado al 13% para *T. dimidiata*. Los datos colectados hasta tres años después indican que *T. dimidiata* presenta una tendencia a la recuperación, mientras que esto no ocurre con *R. prolixus*. En el año 1998 la seroprevalencia de Jocotán fue de 12.1% y Camotán de 11.1% y para el año 2006 se redujo a 4.3% y 1.6 % respectivamente (Cordón, Pennington, 2004).

En 1995 fue reportado la transmisión de *T. cruzi* por *Rhodnius prolixus* en Guatemala en 5 de los 22 departamentos del país. De 2000 a 2007 el Programa Nacional con apoyo de JICA registró la presencia del vector en 317 localidades de 32 municipios en 9 departamentos, que son intervenidas con rociamiento de insecticidas. En 2008 una Comisión Internacional de Evaluación, visita el país para analizar la información registrada, obtener testimonios institucionales, de los técnicos responsables y hacer observaciones en terreno. La vigilancia entomológica no reporta el vector desde hace 2 años y la seroprevalencia en población joven se ha reducido drásticamente (Orozco, 2009).

En estudios realizados por la OMS durante el año 2000, *T. dimidiata* se encontraba en 18 de los 22 departamentos y *R. prolixus* en 5 departamentos. Las tasas de infestación variaban entre 12 y 35%; el sistema deficiente de control de bancos de sangre y la prevalencia de donaciones de sangre infectadas llegó hasta 8% en algunas áreas. Las actividades de control vectorial son ejecutadas por parte del Programa Nacional en los 5 departamentos considerados prioritarios por la alta infestación de *R. prolixus*: Zacapa, Chiquimula, Jalapa, Jutiapa y Santa Rosa. En 2001, encuestas serológicas en población escolar en los mismos 5 departamentos prioritarios se encontró una prevalencia de infección de 4.9%. El control de la transmisión transfusional se está realizando en varios hospitales y se ha encontrado una prevalencia de 0.84%. Para el año 2000 la OMS declaró a Guatemala libre de *R. prolixus* como vector de transmisión, después de ejecutarse programas para su eliminación (OPS/OMS, 2001).

En el 2001 la OMS estimó que en Guatemala 780,000 personas están en riesgo de adquirir la enfermedad, de las cuales 30,000 se infectan cada año. El diagnóstico de la enfermedad de Chagas es difícil y el tratamiento no está disponible comercialmente en el país (OMS, 2005).

La mayoría de los casos sospechosos de la enfermedad en Guatemala se detectaron en bancos de sangre al efectuar pruebas de tamizaje a donadores, en investigaciones realizadas por USAC y Universidad del Valle de Guatemala (UVG) / Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC)- Investigaciones y Adiestramiento en Entomología Médica (MERTUG) y en hospitales públicos durante la fase crónica con daño en los pacientes de tipo irreversible (OPS/OMS, 2001).

En Guatemala en el 2005, se estimó que 4 millones de personas estaban en riesgo de adquirir la enfermedad, 730,000 personas estaban 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. Se estima que en América latina, 90 millones de personas viven en área endémica de ella 16 a 18 millones están infectados por *Trypanosoma cruzi*, provocando alrededor de 21,000 muertes cada año y de 10 a 15% de los enfermos quedan discapacitados a causa de los daños cardíacos y digestivos (Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. 2005).

En Guatemala, las actividades de control implementadas por el Ministerio Nacional de Salud y Asistencia Social (MSPAS) iniciaron en el año 2002 como un programa especial con el apoyo de la agencia Japonesa de Cooperación Internacional (JICA), La Organización Panamericana de Salud (OPS) y de la Universidad San Carlos de Guatemala (USAC).

La organización panamericana de salud para el 2005, estimó que Guatemala contaba con una población de 12,599,000 habitantes, de los cuales 250,000 estaban infectados con la Enfermedad de chagas y 2,100,000 habían estado expuestos a zonas endémicas. (Organización Panamericana de la Salud, 2005).

El sistema de información gerencial de salud registra 100 casos de Enfermedad de Chagas en el periodo del 2001-2009, el mayor número de casos fueron reportados en los años 2004, 2005 y 2008, pertenecientes a los departamentos de Zacapa (54 casos), Alta Verapaz (9 casos), Guatemala (9 casos), Chiquimula (6 casos), Jutiapa (5 casos), El progreso (4 casos), Escuintla (4 casos), El Petén (3 casos), Santa Rosa (3 casos) y Jalapa (3 casos) . La vigilancia de la enfermedad de Chagas en Guatemala se hace por vigilancia pasiva y tamizaje de sangre, la vigilancia entomológica es de base comunitaria. El sistema de

información funcional gerencial en salud funciona parcialmente, debido a que no todos los casos detectados por bancos de sangre son reportados en su totalidad (Ozorio, 2009).

Cabe mencionar que para el año 2009, Jutiapa presentó una población en riesgo de adquirir la infección de 332,902 habitantes, lo cual representa aproximadamente el 78% de la población total del departamento, además se ha reportado a través de las pruebas que se realizan en el banco de sangre del Hospital Nacional de Jutiapa una positividad de 4% para la infección por el parásito. Actualmente se han hecho estudios de evaluación y estandarización de los métodos diagnósticos para la enfermedad, además de investigaciones epidemiológicas del vector, reservorios, caracterización biológica de las cepas (Berganza, 2010).

El área Chagásica en Guatemala para el 2009 se localizó en 10 departamentos del país, estratificados en tres grupos, determinados por el riesgo (tasa de infestación vectorial) y la prevalencia de la enfermedad (tasa de prevalencia) clasificados en grupos de alto, mediano y bajo riesgo. El área de alto riesgo y alta prevalencia abarca Santa Rosa, Jutiapa, Jalapa y Chiquimula. El área de alto riesgo y baja prevalencia abarca Zacapa, El Progreso y Baja Verapaz. Y por último, el área de alto riesgo y baja prevalencia abarca Alta Verapaz, El Quiché y Huehuetenango (Ozorio, 2009).

### **C. Fisiopatología**

Dado que la enfermedad de Chagas no presenta una patogenia que se conozca con exactitud, se ha asociado a cinco posibles mecanismos:

- a) Lesión directa, de tipo mecánico, por parasitismo de las células por el *T. cruzi*.
- b) Lesión producida por toxinas liberadas por el parásito.
- c) Alteración del sistema nervioso autóctono.
- d) Lesión inducida por la respuesta autoinmune del hospedero.
- e) Lesión micro vascular

El parásito causante de la enfermedad de Chagas juega un papel importante en el desarrollo de lesiones en diferentes órganos como el corazón, esófago y colon; induciendo una respuesta inflamatoria, fibrosis o lesiones celulares.

El órgano que con mayor frecuencia se ve afectado con la enfermedad de Chagas es el corazón, debido a una significativa destrucción del sistema de conducción, miocitos y nervios cardíacos parasimpáticos. Sus alteraciones suelen consistir en un agrandamiento de la cavidad ventricular, adelgazamiento de las paredes ventriculares, aneurismas apicales y atrofia de células miocárdicas, infiltración linfocitaria. La

hipertrofia de los miocitos restantes y la intensa fibrosis reemplazan a los miocitos destruidos, produciendo una dilatación y falla cardíaca (Salazar, Marin, 2006).

#### **D. Etapas de la Infección**

Las manifestaciones clínicas presentadas por la enfermedad de Chagas varían según la etapa de la infección.

##### **1. Fase aguda**

En la mayoría de los casos el período agudo es asintomático, pero en las personas sintomáticas dura alrededor de 4 a 8 semanas e incluso se puede prolongar hasta los 4 meses. El periodo de incubación del parásito es variable y entre otros factores depende de la vía de transmisión. Si la penetración es por la conjuntiva ocular, se produce el llamado signo de Romaña, que se caracteriza por la aparición de edema bipalpebral unilateral, elástico e indoloro, acompañado de coloración rojo-violácea de los párpados, congestión conjuntival e inflamación de los ganglios linfáticos satélites preauriculares, generalmente, pero también pueden estar comprometidos los parotídeos o submaxilares; cuadro clínico que desaparece espontáneamente en dos o tres semanas (Cevallos, Hernández, 2005).

Si la penetración fue a través de la piel, aparece el denominado chagoma de inoculación, en cuyo caso se presenta como nódulo subcutáneo, redondeado, eritematoso duro e indoloro acompañado de adenopatías y fiebre (Storino. 2002).

Aunque la afectación aguda es sintomática en aproximadamente el 1 al 10% de los casos, el síntoma más característico es la fiebre, usualmente prolongada, constante (37,5 a 38,5°C), acompañada de fatiga, cefalea, miocarditis, derrame pericárdico, taponamiento cardíaco, hepatomegalia o esplenomegalia, y adenopatías. A veces ocurren erupciones cutáneas, pérdida de apetito, diarrea o vómitos. En general, los síntomas persisten por 4 a 16 semanas dependiendo de la gravedad, y luego la mayoría desaparecen incluso sin tratamiento etiológico sin dejar secuelas aparentes. La mayoría de las personas infectadas no buscan atención médica (Salazar, Marin, 2006).

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 (Cevallos, Hernández, 2005).



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 (Blanco, Segura, Gürtler, 2003).

## 2. Fase indeterminada

Representa un 50% a 70% de todas las personas con Chagas y se caracteriza por la ausencia de síntomas cardíacos, digestivos y otros. Los pacientes están infectados presentando serología y/o parasitemia positiva, pero los exámenes de laboratorio rutinarios son normales. Un 30% de estos pacientes mantiene esta forma durante toda su vida, el resto puede evolucionar a una forma crónica determinada en un lapso de 10 a 30 años (Ministerio de Salud, Gobierno de Chile, 2010).

La fase indeterminada comienza con la remisión de los signos y síntomas de la fase aguda y con la reducción del número de tripomastigotes sanguíneos circulantes. Se desarrolla de manera silenciosa, el paciente se encuentra totalmente asintomático y culmina con las primeras manifestaciones de la miocardiopatía chagásica crónica o permanecen crónicamente indeterminados. Todos los pacientes infectados atraviesan este período, pero sólo el 20 al 30 % presentarán en su evolución evidencias clínicas de la enfermedad. Hay una disminución progresiva de la parasitemia y un incremento concomitante de la respuesta inmune. Esto condiciona que el hallazgo directo del *T. cruzi* sea difícil, prefiriéndose el diagnóstico a partir de la búsqueda de los anticuerpos específicos mediante las reacciones serológicas (Storino, 2002).

El diagnóstico en esta fase se confirma mediante serología positiva (anticuerpos IgG) en dos pruebas serológicas de principio diferente, en ausencia de manifestaciones clínicas, de hallazgos electrocardiográficos compatibles con cardiopatía chagásica crónica y con estudios radiográficos de tórax y digestivos normales. En zonas endémicas en las que persiste la transmisión vectorial, esas personas sirven de reservorio natural de la infección por *T. cruzi* y contribuyen al mantenimiento del ciclo vital del parásito. Estos pacientes pueden ser identificados mediante encuestas epidemiológicas y tamizajes serológicos como los que se realizan en banco de sangre (Storino, 2002).

## 3. Fase crónica

Ocurre cuando se ha instaurado un daño orgánico y se presentan en dos formas: cardíaca y digestiva.

La forma cardíaca suele estar representada por la cardiomiopatía chagásica, la cual es la consecuencia clínica más importante de la infección por *T. cruzi* en nuestro país y se detecta clínicamente porque las personas presentan manifestaciones de disnea, sensación de palpitations, edemas, síncope, eventos cerebro-vasculares y paro cardíaco. No se conocen los factores que causan la transición de la forma indeterminada a la forma cardíaca de la enfermedad. Entre los signos más tempranos de afectación cardíaca está la aparición de alteraciones en el electrocardiograma (ECG), principalmente bloqueo de rama derecha del haz de Hiss y otras bradiarritmias, las cuales pueden aparecer años antes que los síntomas. La baja prevalencia del bloqueo de rama izquierda es un rasgo distintivo del cuadro electrocardiográfico de la miocardiopatía chagásica. Las consecuencias clínicas más importantes de la cardiomiopatía chagásica son: la insuficiencia cardíaca, arritmias cardíacas y la tromboembolia. Las arritmias son probablemente la complicación más frecuente, que lleva a la utilización de fármacos antiarrítmicos e incluso en muchas ocasiones a la implantación permanente de marcapasos. En otros casos, aún más graves, la afectación de la función cardíaca progresa a una falla cardíaca, que incluso puede llevar al requerimiento de un trasplante cardíaco (Salazar, Marin, 2006).

La forma digestiva se caracteriza por la destrucción neurovegetativa entérica, causada por la infección por *T. cruzi*, lo que provoca disfunción del sistema digestivo. Las alteraciones son más frecuentes en el esófago y colon cursando con megaesófago y megacolon, respectivamente.

En las personas con sistema inmunológico comprometido, entre ellas las que han contraído el VIH/SIDA, en terapia inmunosupresora, por trasplante ó enfermedades autoinmunes, la enfermedad de Chagas puede ser grave y en ese caso se conoce como *reactivación*. Las manifestaciones clínicas de la reactivación pueden ser similares a las de la fase aguda, aunque también pueden presentarse formas atípicas como la reactivación cerebral. Los signos y síntomas clínicos más importantes relacionados con la enfermedad de Chagas y la inmunosupresión son: la paniculitis, la meningoencefalitis y la miocarditis (Cevallos, Hernández, 2005).

## **E. Tratamiento**

Actualmente para la enfermedad de Chagas no existe una vacuna que permita prevenir el desarrollo de la enfermedad pero existen algunos fármacos que sirven de tratamiento según la fase de enfermedad en la que se encuentre el paciente, los que todavía siguen siendo un desafío para las autoridades de salud por que no han resultado muy eficaces.

## 1. Fase aguda

Para el manejo de la fase aguda de la enfermedad, basta con un tratamiento farmacológico acompañado de sostén sintomático. Para este fin se dispone principalmente de dos drogas: Benzanidazol y nifurtimox.

*El Benzonidazol (Radanil ®) es un fármaco tripanomicida, es el más utilizado en nuestro país. Afecta al parásito en su fase de tripomastigote. Es un derivado 2-nitroimidazólico que bloquea la síntesis de ácidos nucleicos ligándose al ácido desoxirribonucleico (ADN). Dosificación: Se administra durante 60 a 90 días en dosis de: - 5-7 mg, cada doce horas (adultos). - 3-5 mg/Kg./peso al día, c/12 hrs (pediátrica). Se recomienda iniciar el tratamiento con dosis graduales en los primeros cuatro días, para disminuir el riesgo de intolerancia. Los efectos secundarios se dividen en 3 tipos: a). Dermatológicos con erupción cutánea que aparece entre los 7-10 días de tratamiento, edema generalizado, fiebre, adenopatías, mialgia y artralgia. b). Depresión de la médula ósea con trombocitopenia, púrpura y agranulocitosis, que es la manifestación más grave, compromiso neurológico con polineuropatía, parestesia y polineuritis periférica. Está contraindicado en embarazadas y en personas con insuficiencia hepática y renal (Ministerio de salud y Subsecretaría de Salud Pública, 2011).*

*El Nifurtimox (Lampit ®), es más un tripanocida que un amastigotocida, de igual efectividad que el benzonidazol, es mejor tolerado por los niños y más efectivo para las cepas existentes en Argentina, Chile, Venezuela y el sur del Brasil. El CDC (Centers for Disease Control and prevention) lo distribuye como la droga de elección. Actúa mediante la formación de radicales peróxido e hidróxido. Farmacocinética: Se absorbe muy bien por vía oral, experimenta un importante efecto de primer paso hepático, alcanza dosis máximas en plasma a las tres horas y media. Tiene una vida media de tres horas y se metaboliza por el hígado; solo un 5% del fármaco se excreta por la orina, pero sus metabolitos, de los cuales se sospecha tienen también acción tripanosomida, son enteramente eliminados por esta vía. Dosificación: Se administra a dosis de 8 a 10 mg por Kg. de peso por día, repartidas en tomas de cada 6 horas, durante 120 días. La dosis puede variar entre 5-25 mg/k/día, esta última es usada en formas graves como meningoencefalitis o miocarditis aguda, casos en que el tratamiento debe ser supervisado. La dosis máxima es 700 mg al día. De preferencia, el *Nifurtimox* se administra cada 8 horas, después de una ingesta de alimentos. La administración se inicia en forma escalonada iniciando 1:4 de la dosis el primer día, la mitad los días 2 y 3 y la dosis total al día 4, contándose los 60 días desde el momento que inicia la dosis total (Trillo, Garces, Gris, 2008).*

En caso de efectos adversos disminuir la dosis o suspender transitoriamente y tratar los síntomas hasta la desaparición de los efectos adversos. Luego reiniciar la dosis óptima en 3 días, asociando siempre el tratamiento sintomático. En caso de reaparecer estos efectos y compromiso del estado general, se debe

suspender inmediatamente la administración del fármaco. Los efectos secundarios se presentan en el 30% de los casos y son más manifiestos en adultos. Puede producir anorexia, pérdida de peso, manifestaciones gastrointestinales como náuseas, vómitos, dolor abdominal, diarrea, dermatitis y compromiso del sistema nervioso central con insomnio, alucinaciones y psicosis. La polineuropatía periférica está descrita en adultos en 20% de los casos y es dosis dependiente.

El Alopurinol es un Inhibidor de la síntesis de purinas. No es eficaz en el tratamiento de la fase aguda. Se ha utilizado en pacientes trasplantados cardíacos con buena tolerancia. No se ha empleado en niños. Dosis 8,5 mg/kg/día por 60 días repartido en dos tomas.

El Itraconazol es un derivado sintético del Imidazol. Estudios realizados en adultos demostraron la curación parasitológica en 20% de los casos, con 50% de mejoría de las alteraciones electrocardiográficas. Puede originar reacciones adversas de tipo idiopáticas, como la insuficiencia hepática, las que deben ser monitorizadas. Dosis 6 mg/kg/día por 120 días repartido en dos tomas.

El Posaconazol es un agente antifúngico triazólico al igual que el itraconazol. Su mecanismo de acción es la inhibición del metabolismo del ergosterol, su efecto se ha estudiado en modelos murinos inmunocompetentes e inmunodeprimidos. Actúa en tripanosomas resistentes a *Nifurtimox*, *Benznidazol* y Ketoconazol y tiene acción sinérgica con amiodarona contra *T. cruzi*, por lo que se plantea como una alternativa de tratamiento. Hasta la fecha no se ha utilizado en la enfermedad de Chagas humana (Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, 2010).

El Benznidazol está registrado en 5 de 21 países endémicos y Nifurtimox está registrado en 10 de 21 países endémicos. En América Central, el Benznidazol no está registrado en ningún país, pero está incluido en la Lista de Medicamentos Esenciales de Honduras y Nicaragua, mientras que el Nifurtimox está registrado en El Salvador, Guatemala y Nicaragua y está incluido en la Lista de Medicamentos esenciales de El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua. Actualmente en Guatemala se utiliza Nifurtimox o Benznidazol, según disponibilidad, desde 1996, recibiendo tratamiento entre 100 y 150 pacientes por año (Guhl, 2009).

## 2. Fase indeterminada

El *Nifurtimox* y Alopurinol, son eficaces para negativizar parcialmente las parasitemias en aproximadamente el 70% de los casos, con ello se previene la incidencia de cardiopatía o de alteraciones electrocardiográficas (Ministerio de salud y Subsecretaría de Salud Pública, 2011).

### 3. Fase crónica

El tratamiento aplicado a pacientes en esta fase es de sostén, utilizando fármacos antiarrítmicos, relajantes musculares y laxantes. Las megavísceras una vez instaladas son irreversibles. La propuesta quirúrgica es satisfactoria en el megacolon, pero es elevadamente peligrosa en el caso de cardiopatías. En pacientes con cardiomegalia importante e insuficiencia cardíaca congestiva refractaria a las terapias habituales, se ha indicado como una solución el trasplante cardíaco. Ayuda en esta condición el tratamiento etiológico (Ministerio de salud y Subsecretaría de Salud Pública, 2011).

#### **F. Pronóstico**

En la fase aguda el pronóstico depende de la edad, el estado de nutrición, el tipo y la intensidad de manifestaciones presentadas por el paciente. Casi siempre la enfermedad tiene carácter más grave en los lactantes sobre todo en los de corta edad, a los que puede ocasionar la muerte. En la cardiopatía chagásica crónica el pronóstico es variable y depende principalmente, del grado de aumento del corazón, el tipo de trastorno del ritmo cardíaco, del grado de insuficiencia cardíaca y de la tendencia evolutiva de la infección. La muerte puede sobrevenir súbitamente o bien luego del padecimiento imputable a falla del corazón (Salazar, Marin, 2006).

#### **G. Profilaxis**

Las tareas de control de la enfermedad tropiezan con obstáculos culturales, sociales y también económicos. Es por eso que la tarea educativa de las instituciones de salud es determinante y esta enfermedad puede ser un buen ejemplo de cómo la salud de una sociedad va de acuerdo a su nivel cultural y su educación sanitaria.

Existe una gran variedad de insectos triatomínicos vectores del parásito que presentan diferente comportamiento biológico, lo cual hace necesario plantear nuevas estrategias de control vectorial, específicamente contra aquellas especies que se encuentran en el domicilio, en el peridomicilio y en ambientes selváticos. La enfermedad de Chagas selvática es muy difícil de controlar y su combate se reduce a tratar los casos que se presenten. Pero este problema es sumamente escaso en relación con la enfermedad de Chagas peridomiciliaria. En lo que respecta a este último la erradicación del vector se logra mediante campañas masivas de fumigación con deltametrina en forma de polvo húmedo o suspensión concentrada y el mejoramiento de la vivienda (reducción de irregularidades o grietas y encalado de las paredes de la vivienda, sustitución de techos de paja por materiales más lisos).

También es importante que los corrales y gallineros sean construidos lejos de las viviendas, por la función de mantenimiento de la colonia de triatominos que desempeñan los animales y por la cantidad de resquicios que pueden habitar las chinches.

Actualmente, en la mayoría de los países de América Latina se ha establecido por ley la obligatoriedad de que los bancos de sangre dispongan de sistemas de tamizaje para prevenir la transmisión transfusional de *T. cruzi*.

No se ha encontrado una vacuna efectiva dado que la enorme diversidad de antígenos presentados por *T. cruzi*, impide una clara y duradera respuesta inmune. El tratamiento de los pacientes infectados debe de realizarse para evitar las complicaciones de la cronicidad y disminuir la presencia de reservorios humanos (Guhl, 2009).

## **H. Diagnóstico**

En la actualidad hay una gran variedad de métodos que puede ser utilizada para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, cada uno presenta un principio, sensibilidad y especificidad distinta. Estos métodos diagnósticos suelen ser clasificados en métodos directos e indirectos.

### **1. Métodos directos**

Los métodos directos comprueban la presencia de *T. cruzi* mediante la observación del parásito o la detección del material genético, por medio de la observación del agente etiológico y sus características morfológicas.

#### **a. Gota gruesa**

Esta técnica se basa en la detección del parásito en una gota de sangre del paciente, la cual puede ser obtenida ya sea por punción digital o a partir de sangre venosa. Es un método 100% específico, pero de muy baja sensibilidad, dando numerosos resultados falsos negativos, ya que la observación de los mismos depende del tamaño de la gota y la cantidad de parásitos circulantes (Vega, Naquira, 2006).

#### b. Microhematocrito

Consiste en llenar seis capilares heparinizados con sangre periférica, luego se centrifugan, liman y se quiebran entre la capa de leucocitos y eritrocitos. Esta fracción de glóbulos blancos se coloca en un porta y cubre objetos para el reconocimiento del parásito. La sencillez de esta técnica es semejante al de la gota gruesa pero es más rápida y presenta una sensibilidad de 97.6 % (*Vega, Naquira, 2006*).

#### c. Frote sanguíneo

Este puede ser coloreado con Giemsa y observar el parásito que aparece en forma de U, S o media luna o bien la observación microscópica del parásito en sangre fresca colocada entre el porta y cubreobjetos, en donde se observa fácilmente el movimiento del protozoo (*Vega, Naquira, 2006*).

#### d. Técnica de micro Strout

Consiste en recolectar sangre en tubo capilar y centrifugarlo para luego examinar al microscopio la interfase entre la capa de células rojas y glóbulos blancos en búsqueda del parásito moviéndose en la misma. También puede optarse por centrifugar el capilar y luego cortarlo en la interfase para observar una gota de ésta al microscopio. Este método presenta una especificidad del 100% y una sensibilidad del 95%. Es una técnica simple y de buena sensibilidad en casos agudos y congénitos de la enfermedad de Chagas. Se debe observar en el microscopio la presencia de tripomastigotes móviles de *T. cruzi*, con objetivos de 10X ó 40X de aumento. Es aconsejable observar cuidadosamente varias preparaciones en busca de formas móviles del parásito (*Vega, Naquira, 2006*).

#### e. El método de Hoff

Utiliza Cloruro de Amonio (0.87 P/V) para lisar eritrocitos de sangre completa anticoagulada con EDTA y así facilitar la observación del parásito (Ministerio de Salud Publica y Asistencia Social, 2010).

#### f. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Técnica de biología molecular que amplificar un segmento del DNA de *T. cruzi* en muestras clínicas de pacientes. Es útil para ser empleada en diferentes tipos de muestras y tejidos en fase aguda, crónica indeterminada y crónica determinada. La PCR utilizada principalmente de tipo cualitativa, es el examen confirmatorio en inmunodeprimidos y en menores de 9 meses y requiere de dos resultados positivos consecutivos para descartar falsos positivos de la técnica. En el caso de pacientes inmunocompetentes o

mayores de 9 meses el resultado de PCR positivo debe ir acompañado de un resultado de búsqueda de anticuerpos positiva, lo que da por confirmado el resultado (Vega, Naquira, 2006).

El PCR posee alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*, la cual varía entre 96 a 100%, convirtiéndola en una excelente técnica para el seguimiento quimioterapéutico en pacientes con enfermedad aguda. La sensibilidad de la técnica supera la de técnicas convencionales directas (Ministerio de Salud, 2010).

## 2. Métodos indirectos

Estos métodos permiten la detección indirecta del parásito, ya sea por la respuesta humoral que desencadena o por la captura de antígenos que este desencadena.

### a. Xenodiagnóstico

Es una técnica que permite la multiplicación del parásito *in vivo* y se logra dejando que los triatomídeos, criados en el laboratorio y sin infección, se alimenten de sangre por medio de una picadura del paciente sospechoso en la cara anterior del antebrazo. Así, los triatomídeos ingieren las formas típicas de tripanosomas que se convierten en epimastigotes, los cuales se multiplican y producen pequeños tripanosomas metacíclicos que se encuentran en las heces del triatomídeo después de 10 a 40 días. Es aplicable tanto en la forma clínica aguda como en la crónica portador. Es útil en todas las etapas de la enfermedad, con una sensibilidad aproximada del 98% a 100% en la etapa aguda, y de 50% a 70% en crónica en condiciones óptimas. La lectura se realiza al examinar la muestra de heces del vector en el microscopio (objetivo de 20X de aumento), buscando formas móviles: epimastigotes o trypomastigotes metacíclicos del parásito que son identificadas por el movimiento ondulante característico. Un resultado es positivo cuando se observan formas trypomastigotes o epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. De ser la prueba positiva, se puede realizar el aislamiento del parásito sembrando la muestra en medios de cultivo o inoculando experimentalmente en ratones para posteriores estudios de caracterización e identificación (Vega, Naquira, 2006).

### b. Hemocultivo

Consiste en sembrar una muestra de sangre en medio de cultivo artificial o celular, con la finalidad de amplificar el número de parásitos presentes y confirmar el diagnóstico. Presenta una sensibilidad alta en los casos agudos y congénitos. El cultivo en medio artificial es factible de realizarlo en cualquier laboratorio bacteriológico, no así en medio celular que requiere de un laboratorio mejor equipado. La



limitación de la prueba está en el prolongado tiempo de incubación que se requiere (hasta dos meses) para emitir el informe del resultado (Vega, Naquira, 2006).

Se realiza inoculando sangre en medios como LIT (triptosa de infusión de hígado) y BHI (infusión de cerebro corazón). El método es útil para el aislamiento del parásito en los períodos agudo y crónico, y es el método de referencia para el diagnóstico (Charpeniello, 2004).

La lectura del hemocultivo se realiza de la siguiente manera: el movimiento característico de los epimastigotes, permite detectarlos con facilidad. Debe realizarse un extendido de sangre, que se fija con metanol durante tres minutos y se colorea con Giemsa. Se observa en el microscopio la forma típica, el núcleo de color azul violeta y el cinetoplasto más denso y oscuro. Se les visualiza aislado o agrupado a manera de rosetas. Si no se observan formas móviles continuar la incubación a 28 °C y repetir la lectura a los siete días. Se considera un cultivo positivo cuando se observa la presencia de epimastigotes de *T. cruzi* (Vega, Naquira, 2006).

#### c. Ensayo inmunoenzimático (ELISA)

Durante la década de los sesenta, se investigó una gran cantidad de marcadores para la detección de antígenos, anticuerpos y otros componentes séricos, basados en la reacción primaria antígeno-anticuerpo, lo que llevó al desarrollo de técnicas como la inmunofluorometría, radioinmunoensayo y ensayos inmunoenzimáticos (Goldsby, Kindt, Osborne, Kuby, 2004).

Los ensayos inmunoenzimáticos se basan en dos fenómenos importantes; el primero de ellos, consiste en el extraordinario poder discriminatorio que presentan los anticuerpos, lo que le brinda especificidad y afinidad hacia antígenos o haptenos. En segundo lugar es debido al poder catalítico y especificidad de las enzimas lo que permite su fácil detección. El principio de los ensayos inmunoenzimático se basa en dos pasos fundamentales, en la reacción entre los inmuno reactantes (antígeno-anticuerpo) y su detección por medio de la utilización de enzimas indicadoras que se unen a dichos reactantes. Posteriormente el inmunocomplejo unido a la enzima es puesto en manifiesto por medio de la reacción con un sustrato sobre el cual este actúa de forma específica, produciendo un complejo coloreado, el cual es medido con un espectrofotómetro (Vega, Naquira, 2006).

Existen gran cantidad de variantes de los ensayos inmunoenzimáticos, basados en la separación física del antígeno ligado y el no ligado; los métodos que requieren de dicha separación son denominados

heterogéneos y los que no la requieren se denominan homogéneos. Dentro de los métodos heterogéneos se encuentra el método competitivo en fase sólida, en el cual los antígenos o anticuerpos se adsorben al inmovilizante específico. Estos ensayos recibieron el nombre de ELISA, por sus siglas en inglés, Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Charpeniello, 2004).

En los ensayos competitivos el anticuerpo se encuentra adherido a un pozo, tubo o perlas de poliestireno (fase sólida), por lo que recibe el nombre de inmunoabsorbente; se requiere agregar la muestra que contiene cantidades desconocidas del antígeno a detectar junto con una cantidad conocida de antígeno conjugado con enzimas, ambos antígenos compiten por los sitios de unión de los anticuerpos. Luego hay un periodo de incubación y el lavado de los pozos, para eliminar el conjugado no unido. Posteriormente se requiere de incubación con la solución de sustrato específico para la enzima utilizada, cuya reacción será detenida y medida con un espectrofotómetro (Vega, Naquira, 2006).

Como conjugado pueden ser utilizadas gran variedad de enzimas, las cuales deben ser estables, altamente reactivas, disponibles en forma pura, producir conjugados estables, y que sean económicas. Entre las más utilizadas se encuentra la peroxidasa de rábano y la fosfatasa alcalina por su bajo costo y su fácil conjugación. El sustrato utilizado debe ser barato, seguro y dar productos completamente solubles, además de poseer coeficientes de extinción alto. Entre los sustratos más convenientes se encuentran el p-nitrofenilfosfato y el  $\alpha$ -fenilendiamina. Las reacciones pueden ser detenidas con NaOH o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, el resultado es un producto amarillo bastante estable (Parslow, Suites, Terr, Imboden, 2002).

Los ensayos inmunoenzimáticos se caracterizan por su fácil ejecución, alto grado de reproducibilidad, elevada sensibilidad, fácil adaptación a la automatización y bajo costo (Charpeniello, 2004).

Actualmente las compañías comerciales tienen a disposición distintas presentaciones de los ensayos inmunoenzimáticos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Entre ellos se encuentran los que detectan anticuerpos IgG, que utilizan adhesivos biológicos para la activación de las placas, lo que facilita la inmovilización del antígeno ofreciendo así una alta sensibilidad, denominándolo así ensayo de segunda generación. Además existen otros ensayos que utilizan antígenos recombinantes a partir de proteínas específicas de los estadios de epimastigote y tripomastigote de *T. cruzi*, ofreciendo resultados reproducibles, específicos y altamente sensibles (Matta, 1994).

El ensayo inmunoenzimático se lleva a cabo en fase sólida para la detección cualitativa de anticuerpos contra *T. cruzi* que se realiza en placas cuyos pocillos han sido activados con extractos totales de las cepas de *T. cruzi* y antígenos de membrana altamente inmunogénicos. Si las muestras analizadas contienen anticuerpos específicos para *T. cruzi*, éstos formarán un complejo estable con los antígenos que recubren los pocillos; el material unido en forma inespecífica es eliminado por medio del lavado y durante la incubación con el conjugado, los anticuerpos anti-IgG humana marcados con la enzima se unen al complejo formado. Finalmente, en la etapa de incubación con el sustrato cromogénico se produce una coloración que permite detectar las muestras reactivas para *T. cruzi*. La reacción enzimática se detiene por la adición de ácidos (generalmente), finalmente se mide la intensidad del color en un lector colorimétrico para placas de ensayos inmunoenzimáticos, la sensibilidad de éste método es del 96% y su especificidad es del 99% (Charpeniello, 2004).

#### d. Inmuno blot

Antes de la aparición del Inmuno blot, ya existían diversas técnicas capaces de detectar un antígeno determinado en la muestra, como la inmunolectroforesis, la inmunodifusión doble de Ouchterlony, la inmunoprecipitación.

En 1975, Edwin Southern demostró que la nitrocelulosa era capaz de capturar todos los ácidos nucleicos separados previamente por electroforesis. De esta forma, se permitía el análisis de una mezcla compleja de moléculas de ADN, como un genoma tratado con enzimas de restricción. Se desarrolló así el Southern blot, utilizando el nombre del descubridor. Más tarde, Towbin en 1979 y Brúñete en 1981 demostraron que también era capaz de unirse a proteínas. Ya en 1986, Millipore desarrolló la primera membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF), diseñada para la transferencia de proteínas (Vega, Naquira, 2006).

El Inmuno blot es una técnica analítica usada para detectar proteínas específicas en una muestra determinada (dentro de una mezcla de proteínas). Mediante una electroforesis en gel se separan las proteínas atendiendo el criterio que se desee: peso molecular, estructura, hidrofobicidad, etc. Hay tantas posibilidades como tipos de electroforesis existentes. Luego son transferidos a una membrana absorbente (de nitrocelulosa o de PVDF) para poder buscar la proteína de interés con anticuerpos específicos contra ella. Finalmente se detecta la unión del antígeno – anticuerpo por actividad enzimática o fluorescencia. De esta forma se puede estudiar la presencia de la proteína en el extracto y analizar su cantidad relativa respecto a otras proteínas (Vega, Naquira, 2006).

Esta técnica es hoy en día imprescindible en varios campos de la biología, como la biología molecular, la bioquímica, la biotecnología o la inmunología. Existe toda una industria especializada en la venta de anticuerpos monoclonales o policlonales contra decenas de miles de proteínas diferentes (Paz, Ortega, 1,994).

El Inmuno blot es empleado en el estudio de antígenos purificados, con el propósito de implementar pruebas serológicas altamente sensibles y específicas. Es una técnica muy sensible que permite identificar anticuerpos contra *T. cruzi*. Esta técnica se basa en la separación electroforética de proteínas en geles de poliacrilamida, la transferencia (blotting) de dichas proteínas a un soporte sólido (membrana de nitrocelulosa o nylon) y la posterior detección de una o más bandas identificadas por anticuerpos específicos. La migración de las proteínas se realiza en presencia de detergentes (Dodecil Sulfato de Sodio, SDS) a fin de que su migración dependa fundamentalmente del peso molecular de los péptidos. Así descrita, la técnica permite investigar la presencia de anticuerpos específicos en suero, para ello cuenta con el antígeno de *T. cruzi* separado por electroforesis y transferido a una membrana, la cual se incubará con el suero a analizar. Posteriormente esa membrana deberá incubarse con el segundo anticuerpo marcado con la enzima para poder detectar las bandas específicas (Vega, Naquira, 2006).

#### e. Hemaglutinación indirecta (HAI)

La hemoaglutinación indirecta emplea glóbulos rojos de carnero, previamente tratados con ácido tánico, como soporte de extractos solubles del parásito (antígeno). Es una prueba altamente sensible y específica (Vega, Naquira, 2006).

La reacción de hemaglutinación indirecta permite detectar anticuerpos específicos anti-*T. cruzi* mediante la utilización de eritrocitos sensibilizados con antígenos de parásitos de cultivo, ya que los mismos aglutinan en presencia de estos anticuerpos.

Se debe recordar que aunque la HAI es considerado como un método confiable para la detección de anticuerpos específicos anti-*T. cruzi*, los resultados deben ser confirmados con otras técnicas que se basen en principios diferentes (IFI, ELISA). Esta reacción es más sensible pero menos específica que la fijación de complemento, la sensibilidad es mayor en las formas crónicas que en las agudas (Organización Panamericana, 1984).

Esta técnica puede aplicarse al reconocimiento de anticuerpos contra los antígenos de superficie si se sensibilizan los eritrocitos de carnero con las glicoproteínas de membrana del *T. cruzi*, mediante la acción de lecitinas. De esta forma se reconocen anticuerpos de tipo IgM, que resultan indicados para el estudio

de la infección aguda. Reacciones serológicas que reconocen anticuerpos contra antígenos citoplasmáticos del *T. cruzi*; presentan una sensibilidad y especificidad del 99%. Al momento de realizar la lectura, la falta de reactividad (negativo), se manifiesta por la sedimentación del antígeno en forma de botón. La reactividad del suero (positivo), se manifiesta por la formación de una malla de bordes irregulares que cubre al 50-100% del fondo del pocillo. Se considera positiva la muestra a partir de la dilución 1:4 y se informa con el título de la última dilución positiva (Vega, Naquira, 2006).

#### f. inmunofluorescencia indirecta

La técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), emplea como antígeno epimastigotes de *Trypanosoma*, obtenidos de cultivo y fijados en láminas sobre las que se realiza la reacción antígeno-anticuerpo. La formación de este complejo es evidenciada por una antiglobulina humana marcada con fluoresceína.

El método de inmunofluorescencia indirecta permite la identificación de anticuerpos en sueros o fluidos no marcados. En esta técnica el anticuerpo no conjugado es expuesto al antígeno epimastigote o tripomastigote de *T. cruzi*, luego de esta unión se lava y la reacción se evidencia con un segundo anticuerpo conjugado (antiglobulina). Un aspecto importante de esta técnica es que puede utilizarse un conjugado polivalente o bien monovalente, dependiendo el tipo de inmunoglobulina a detectar, es decir que un conjugado polivalente detecta cualquier clase de anticuerpo, mientras que uno monovalente es específico contra una sola clase de inmunoglobulina (IgG, IgM o IgA). Una de las ventajas de esta técnica es que permite la detección de anticuerpo IgM, después de 2 a 3 semanas de iniciada la infección chagásica (Vega, Naquira, 2006).

#### g. Reacción de fijación de complemento

Un anticuerpo específico en presencia de antígenos de *T. cruzi* es capaz de unirse formando la unión antígeno-anticuerpo, la cual es capaz de fijar complemento por la fracción Fc de la inmunoglobulina. Esta unión no visible es puesta en evidencia por un sistema indicador que permite que el complemento libre (esto es en ausencia de anticuerpo) produzca la hemólisis del sistema hemolítico formado por hematíes de carnero y hemolisina (antisuero antihematíes de carnero preparado de conejo). La técnica utilizada de rutina es la hemólisis al 100%, la que a pesar de los cuidados en controles y exacta preparación ofrece mayor aplicabilidad que la utilización de hemólisis al 50%. La técnica de hemólisis al 100% ha demostrado tener una sensibilidad del 35% en el diagnóstico del caso agudo durante el primer mes, la que aumenta al 71% en el segundo mes. Usualmente la evaluación de esta técnica confirma una sensibilidad del 90% para la fase crónica (Beeson, 1998).

## I. Concordancia entre pruebas

Un análisis de concordancia se usa para comparar diversos métodos clínicos entre si cuando son aplicados al mismo grupo de individuos.

La manera tradicional para realizar este estudio es mediante la aplicación de modelos estadísticos que realizan la comparación de dos proporciones, o bien la asociación matemática entre dos factores. Se analizan dos métodos o pruebas de laboratorio cuyos resultados se expresan en forma binaria (positivo/negativo), se utiliza cuando a cada individuo se le estudia con dos métodos clínicos a la vez y sus valores verdaderos son desconocidos.

Una manera de estudiar la concordancia es analizando si ambos métodos son independientes desde el punto de vista estadístico. Entonces la hipótesis nula plantea la independencia y cuando es rechazada por la prueba estadístico se dice que ambos métodos están asociados y dicho grado de asociación se compara con una tabla de aceptabilidad de la concordancia. El método más utilizado con este enfoque es el método Kappa. El valor obtenido del índice se compara con los criterios siguientes:

- a) Si es nulo se dice que la concordancia es pobre
- b) Si esta entre 0 y 0.2 la concordancia es muy leve
- c) Si esta 0.2 y 0.4 la concordancia es leve
- d) Si esta entre 0.4 y 0.6 es moderada
- e) Si esta entre 0.6 y 0.8 es substancial
- f) Y entre 0.8 y 1.0 casi perfecta

El objetivo de obtener este índice es obtener la concordancia observada, la parte de concordancia debida al azar. Para solucionar este problema se utiliza el método phi, llamado concordancia de independencia-azar. Este es el método recomendado por la Asociación Médica Americana en su guía de usuarios, dado a que presenta varias ventajas basadas es su relación con el índice Odds Ratio (Azzimonti, 2005).

### III. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Chagas es una de las enfermedades parasitarias más importantes en América Latina. En Guatemala más de 330,000 personas viven en condiciones de alto riesgo de adquirir la infección (Ministerio de Salud, 2010).

La detección de anticuerpos séricos para los componentes de *T. cruzi* es el principal soporte para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en la etapa indeterminada y crónica, ya que los métodos parasitológicos requieren de 20 a 60 días, poseen menor sensibilidad, son laboriosos y en algunos casos pueden representar un procedimiento doloroso y traumático para el paciente.

Dentro de los avances en los estudios e investigaciones anteriores realizados por la Comisión de Control de Chagas, Ministerio de Salud Pública y USAC, se ha logrado erradicar a *R. prolixus* como vector de Chagas. Pero aun es necesario realizar más investigaciones que logren identificar a la población infectada o en riesgo de infectarse y así disminuir las muertes causadas por dicha enfermedad.

Siendo Guatemala un área endémica de la enfermedad de Chagas, es necesario contar con pruebas altamente sensibles y específicas para el diagnóstico de la misma, las cuales permitirán obtener resultados reales de la población y que aporte información valiosa al Ministerio de Salud pública para que realicen las correspondientes intervenciones en caso de ser necesario.

#### IV. OBJETIVOS

##### A. Objetivos Generales:

1. Evaluar dos métodos para la detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*.

##### B. Objetivos Específicos:

1. Determinar la sensibilidad y especificidad de los dos métodos evaluados (ELISA e Inmuno blot Novatec® para la detección de anticuerpos IgG anti *T. cruzi*).
2. Determinar la concordancia de ambos métodos utilizando el índice Kappa.



## V. MATERIALES Y METODOS

### A. Universo de trabajo

Pruebas serológicas para la detección de anticuerpos IgG anti *T. cruzi*.

### B. Muestra

Dos tipos de pruebas serológicas (ELISA e Inmuno blot) para la detección de anticuerpos IgG anti *T. cruzi*, donados por Novatec®.

### C. Recursos

#### 1. Recursos humanos

a. Estudiantes de Química Biológica: Melanie Verena Gramajo López, Eugenia Raquel González Aldana

b. Asesoras: Licda. Karla Lange, Vivian Matta MSc.

#### 2. Recursos institucionales

a. Departamento de Citohistología de la Escuela de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

#### 3. Recursos materiales

### D. Reactivos suministrados

- ♣ Chagas (*Trypanosoma cruzi*) IgG- NovaLisa™ ELISA –NovaTec®
- ♣ Inmunodiagnostic IgG Chagas (*Trypanosoma cruzi*) –NovaTec®

### E. Materiales y equipos necesarios

- Espectrofotometro
- Vortex.
- Pipetas automaticas de 1000 y 10 µl

### F. Procedimiento

#### 1. Selección de sueros

Los sueros fueron seleccionados por conveniencia (se eligieron sueros del Departamento de Citohistología de la Escuela de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala que presentaron el mismo resultado con cinco pruebas de diferente principio, obtenidos 3 meses previos a la realización del estudio en los departamentos de Chiquimula y Zacapa).

- ♣ 50 sueros control positivos altos

- ♣ 13 sueros control positivos bajos
- ♣ 50 sueros control negativos
- ♣ 76 sueros positivos
- ♣ 308 sueros negativos

La cantidad de sueros utilizados son los necesarios para que los datos obtenidos proporcionen resultados representativos.

**Chagas (*Trypanosoma cruzi*) IgG- NovaLisa™ ELISA -NovaTec®**

1. Dispensar 100µl de cada control y muestras diluidas en los pocillos respectivos. Dejar el pocillo A1 para el blanco.
2. Cubrir los pocillos con la lámina adhesiva suministrada en el kit.
3. Incubar durante 1 hora  $\pm$  5 min a  $37 \pm 1$  ° C.
4. Cuando se ha completado la incubación, retirar el autoadhesivo, aspirar el contenido de los pocillos y lavar cada pocillo tres veces con 300µl de solución de lavado. Evitar el rebosamiento de los pocillos de reacción. El tiempo entre cada ciclo de lavado debe ser mayor a 5 seg. Al final eliminar cuidadosamente el fluido restante secando con papel absorbente. Nota: El lavado es muy importante! Un mal lavado provoca una mala precisión y valores de absorbancia falsamente elevadas.
5. Dispensar 100µl de conjugado en cada pocillo con excepción del blanco (por ejemplo, A1). Cubra con papel aluminio.
6. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. No lo exponga a la luz solar directa.
7. Repetir el paso 4.
8. Verter 100µl de solución de sustrato TMB en todos los pocillos 100µl.
9. Incubar durante exactamente 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.
10. Dispensar 100µl de solución de parada en cada pocillo en el mismo orden y al mismo ritmo que con el sustrato de TMB. Toda coloración azul formada durante la incubación se convierte en amarilla.

Nota: Muestras que son altamente positivas pueden causar precipitados negros del cromógeno. Estos precipitados influyen en la lectura de la densidad óptica.

11. Medir la absorbancia de la muestra a 450/620nm dentro de 30 minutos después de añadir la solución de parada.

Se calculara las unidades Novatec (NTU) teórica y de cada muestras de suero utilizada, Si es mayor de 0.648 será considerado positivo y si es menor a este valor se considerara negativo.

#### **Inmunodiagnostic IgG Chagas (*Trypanosoma cruzi*) –NovaTec®**

Antes del ensayo, las muestras deben ser diluidas 1:100 con IgG diluyente de muestra. Dispensar 10 µl de muestra y 1 ml de IgG diluyente de muestra en tubos para obtener una dilución 1:100 y mezclar con el vórtex.

1. Con unas pinzas, retirar con cuidado el número de tiras de antígenos necesaria del tubo y colocarlos en los canales de la bandeja de incubación.

2. Transferir 1 ml de control y muestra diluida a los canales correspondientes de la bandeja de incubación. Comprobar que todas las tiras de antígeno esten completamente sumergidas y si es necesario, agitar suavemente la bandeja o empujar delicadamente las tiras en la solución con una punta de pipeta limpia. El lado numerado de la tira debe quedar hacia arriba. Los antígenos se unen a este lado de la membrana.

3. Incubar las tiras a temperatura ambiente durante 60 min en una plataforma de agitación.

4. Lavar de la siguiente manera

- ♣ Aspirar cuidadosamente el contenido de cada canal añadir 1 ml de solución de lavado
- ♣ colocar la incubación, bandeja sobre la plataforma de agitación durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- ♣ Aspirar el contenido de cada canal y repita el procedimiento de lavado dos veces más.

5. Añadir 1 ml de IgG anti-conjugado a los canales apropiados e incubar a temperatura ambiente durante 30 min en la plataforma de agitación

6. Lavar repitiendo el paso 4.

7. Añadir 1 ml de TMB membrana de solución de sustrato cromogénico a los canales apropiados e incubar durante 10 min a temperatura ambiente y bajo observación sobre la plataforma de agitación.  
Precaución: no sobredesarrollar. Algunas muestras muestran tinción de fondo excesivo de las tiras. Para evitar el fondo, es posible detener la reacción antes de un lavado con agua desionizada.
8. Detener la reacción mediante la aspiración de los contenidos de cada canal y enjuagar cada tira con 1 ml de agua desionizada. Volver a colocar la bandeja de incubación en la plataforma de agitación durante 5 minutos repita el enjuague 5min 1 ml.
9. Sacar las tiras de la bandeja de incubación y colocarlos con la cara hacia arriba sobre papel de filtro (aproximadamente 30 min a temperatura ambiente) de secado a 37 ° C durante 15 min, se puede ayudar a reducir la señal de fondo si las tiras se hicieron oscuro durante el desarrollo  
Se considerara positiva la prueba si hay presencia de dos bandas gris, una en el área de control y otra en el área correspondiente de la tira para la detección de anticuerpos anti *T. cruzi*, sin tomar en cuenta la intensidad de la misma. Si no presenta ninguna banda será considerada negativa si y solo si se observa la banda control.

#### **F. Diseño estadístico**

**1. Tipo de estudio** Descriptivo

**2. Diseño de muestreo** No probabilístico por conveniencia, la prueba se validó con un panel de sueros como muestras ciegas.

**3. Análisis de resultados** Determinar la sensibilidad y especificidad relativa para la prueba y la Concordancia con el panel de sueros de referencia a través del coeficiente Kappa.

## VI. RESULTADOS

Para la realización de este estudio fueron seleccionados por conveniencia 383 sueros, los cuales previamente fueron colectados por el Departamento de Citohistología de la Escuela de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala en áreas endémicas del país (Chiquimula y Zacapa), tres meses previos a la realización del estudio. Dichos sueros habían sido analizados con cinco diferentes pruebas comerciales basadas en metodologías como hemaglutinación indirecta, Inmunoensayo enzimático (ELISA) con anticuerpos crudos y recombinantes.

Se seleccionaron los sueros que presentaron resultados concordantes con las diferentes pruebas, eligiéndose al método Inmunoensayo enzimático recombinante como método de comparación, debido a que presenta como ventaja el permitir procesar un elevado número de muestras y además, permite obtener mejores resultados en muestras de sangre entera (sangre con glicerina, papel de filtro) así como también fluidos biológicos como el trasudado mucoso oral. Éste método ha sido evaluado en varios estudios y ha presentado una sensibilidad de 98.80% y una especificidad de 99.62% (WHO, 2010).

Se incluyeron 111 sueros control, los cuales han sido clasificados como positivos o negativos para anticuerpos IgG anti *T. cruzi* por dos metodologías, ELISA y hemaglutinación indirecta. Conformados por 50 sueros negativos y 61 sueros positivos, los cuales fueron seleccionados al azar del Departamento de Citohistología de la Escuela de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

En la Tabla 1 se presentan los resultados obtenidos al comparar los 111 sueros control con el método ELISA Novatec®. El método ELISA Novatec® proporcionó 50 resultados positivos de los 61 sueros control positivos utilizados y 47 resultados negativos de los 50 sueros control negativo. Dando resultados falsos positivos para 3 sueros y resultados falsos negativos para 9 sueros. Se obtuvo 2 resultados indeterminados para dichos sueros.

Se presentan los resultados obtenidos al comparar el método Inmunoblot Novatec® con los sueros control. El método Inmunoblot Novatec® proporcionó 54 resultados positivos de los 61 sueros control positivos utilizados y 47 resultados negativos de los 50 sueros control negativos. Dando resultados falsos positivos para 6 sueros y resultados falsos negativos para 4 sueros. Se obtuvo 8 resultados indeterminados para dichos sueros.

**Tabla 1.** Comparación de sueros control con los métodos a prueba (ELISA Novatec® e Inmunoblot Novatec®)

		Sueros Control			
		Positivo	Negativo	Indeterminado	
<b>Método ELISA Novatec®</b>	<b>Positivo</b>	50	3	0	<b>53</b>
	<b>Negativo</b>	9	47	0	<b>56</b>
	<b>Indeterminado</b>	2	0	0	<b>2</b>
	<b>Total</b>	<b>61</b>	<b>50</b>	<b>0</b>	<b>111</b>
<b>Método Inmunoblot Novatec®</b>	<b>Positivo</b>	54	6	0	<b>60</b>
	<b>Negativo</b>	4	39	0	<b>43</b>
	<b>Indeterminado</b>	3	5	0	<b>8</b>
	<b>Total</b>	<b>61</b>	<b>50</b>	<b>0</b>	<b>111</b>

Fuente: Datos experimentales

En la Tabla 2 se presenta el resumen de los resultados obtenidos al realizar las pruebas a los 111 sueros control con los métodos ELISA Novatec® e Inmunoblot Novatec®. Se observa que el método Inmunoblot Novatec® permitió detectar 54 resultados positivos de los 61 esperados, mientras que el método ELISA Novatec® solo permitió la detección de 50 de estos resultados. Al evaluar los resultados negativos se puede observar que el método ELISA Novatec® permitió identificar 47 de los 50 sueros negativos esperados, mientras que el método Inmunoblot Novatec® solo permitió identificar 39 de estos sueros. El método ELISA Novatec® proporcionó 10 resultados falsos negativos, mientras que el método Inmunoblot Novatec® solo proporcionó 4. Caso contrario de lo que ocurrió con los falsos positivos, donde el método Inmunoblot Novatec® proporcionó 6 de estos resultados y el método ELISA Novatec® solo 3.

**Tabla 2.** Concordancia de los resultados obtenidos con los métodos ELISA Novatec® e Inmuno blot Novatec® en comparación con sueros control.

Método	Resultados				
	Positivo	Negativo	Falso Positivo	Falso Negativo	Indeterminado
Sueros control	61	50	0	0	0
ELISA Novatec®	50	47	3	10	2
Inmunoblot Novatec®	54	39	6	4	8

Fuente: Datos experimentales

En la Tabla 3 se presenta la tabla 3x3 con los resultados obtenidos al comparar el resultado obtenido con los 383 sueros al evaluarlos con el método ELISA Novatec® y el método de referencia (ELISA Recombinante). El método ELISA Novatec® proporcionó 75 resultados positivos de los 77 sueros control positivos utilizados y 298 resultados negativos de los 306 sueros control negativos. Dando resultados falsos positivos para 4 sueros y resultados falsos negativos para 1 suero. Además se obtuvo 5 resultados indeterminados para dichos sueros.

Además se presenta una tabla 3x3 con los resultados obtenidos al comparar el método Inmunoblot Novatec® con el método de referencia (ELISA Recombinante). El método Inmunoblot Novatec® proporcionó 75 resultados positivos de los 77 sueros control positivos utilizados y 242 resultados negativos de los 306 sueros control negativos. Dando resultados falsos positivos para 22 sueros y resultados falsos negativos para 1 suero. Se obtuvo 43 resultados indeterminados para dichos sueros.

**Tabla 3.** Comparación del método de referencia (ELISA Recombinante) con los métodos a prueba (ELISA Novatec® e Inmunoblot Novatec®)

		Método ELISA Recombinante			
		Positivos	Negativos	Indeterminado	
Método ELISA Novatec®	Positivos	75	4	0	<b>79</b>
	Negativos	1	298	0	<b>299</b>
	Indeterminado	1	4	0	<b>5</b>
	<b>Total</b>	<b>77</b>	<b>306</b>	<b>0</b>	<b>383</b>
Método Inmunoblot Novatec®	Positivos	75	22	0	<b>97</b>
	Negativos	1	242	0	<b>243</b>
	Indeterminado	1	42	0	<b>43</b>
	<b>Total</b>	<b>77</b>	<b>306</b>	<b>0</b>	<b>383</b>

Fuente: Datos experimentales



En la Tabla 4 se presenta el resumen de los resultados obtenidos al realizar las pruebas a las 383 muestras de sueros con los métodos ELISA Novatec® e Inmunoblot Novatec®. Además se presentan los resultados esperados según el método de referencia (ELISA Recombinante). Lográndose observar que el método ELISA Novatec® permitió detectar 298 resultados negativos de los 306 esperados, mientras que el método Inmunoblot Novatec® solo permitió la detección de 242 de estos resultados. Al evaluar los resultados positivos se puede observar que tanto el método de ELISA Novatec® como el método Inmunoblot Novatec® permitieron detectar 75 de los 77 esperados. El método ELISA Novatec® proporcionó 4 resultados falsos positivos, mientras que el método Inmunoblot Novatec® proporcionó 22. Caso contrario de lo que ocurrió con los falsos negativos, donde ambos métodos presentaron solo 1 de estos resultados.

**Tabla 4.** Concordancia de los resultados obtenidos con los métodos ELISA Novatec® e Inmunoblot Novatec® en comparación con el método de referencia (ELISA Recombinante)

Método	Resultados				
	Positivo	Falso Negativos	Falso Positivo	Falso Negativo	Indeterminado
ELISA Recombinante	306	77	0	0	0
ELISA Novatec®	298	75	4	1	5
Inmunoblot Novatec®	242	75	22	1	43

Fuente: Datos experimentales

En la Tabla 5 se presenta el valor de concordancia para el método ELISA Novatec® y el método Inmunoblot Novatec® representado por el índice Kappa, obtenido al comparar dichos métodos con los sueros control y con el método de referencia (ELISA Recombinante). Como se logra observar el método que presentó mayor concordancia fue el método ELISA Novatec® comparado con el método ELISA Recombinante, presentando un índice Kappa de 0.9220. El método que presentó una menor concordancia fue el método Inmunoblot Novatec® comparado con el método ELISA Recombinante, presentando un índice de 0.6103.

**Tabla 5.** Valores de la concordancia obtenidos para el métodos ELISA Novatec® y el método Inmunoblot Novatec®

<b>Método No.1/ Método No.2</b>	<b>Índice Kappa</b>
ELISA Novatec / ELISA recombinante	0.9220
ELISA Novatec / Estándar de oro	0.7529
Inmunoblot Novatec / Estándar de oro	0.6931
Inmunoblot Novatec / ELISA Recombinante	0.6103

Fuente: Datos experimentales

En la Tabla 6 se presenta la interpretación cuantitativa, que depende del índice Kappa, el cual fue propuesto por Landis y Koch, para facilitar la interpretación de la concordancia entre métodos.

**Tabla 6.** Interpretación cuantitativa del índice de Kappa propuesta por Landis y Koch.

<b>Concordancia</b>	<b>Clasificación</b>
Valores menores a 0.40	Pobre o débil
Valores entre 0.41 – 0.60	Moderada
Valores entre 0.61 – 0.80	Buena
Valores entre 0.81 – 1.00	Muy buena

Fuente: Cortés, Rubio, Guitán. 2010.

## VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Guatemala es un país endémico de la enfermedad de Chagas y la transmisión vectorial sigue siendo la vía de transmisión con mayor frecuencia, sin embargo todas las vías de transmisión han sido consideradas para erradicar dicha enfermedad en el país. Es por ello que la evaluación constante de la presencia de la enfermedad de Chagas en toda la población guatemalteca, le ha servido a las autoridades de salud para generar propuestas que disminuyan la tasa de personas que la presentan, evitar su propagación y evaluar la eficacia de las medidas que se han tomado hasta la fecha. Los ensayos serológicos han demostrado ser una alternativa de intervención aceptable para la detección de portadores de la infección y permiten detectar la presencia de anticuerpos IgG específicos anti *T. cruzi* (Cortés, Rubio, Gaitán, 2010).

No existe método de referencia para Chagas. Los protocolos para diagnóstico de la enfermedad de Chagas recomiendan según el segundo informe del Comité de Expertos de la Organización Mundial de Salud en el 2002, la realización de pruebas convencionales que han sido ampliamente validadas en Centroamérica y Sudamérica. Estas pruebas convencionales son la hemaglutinación indirecta (HAI), la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la prueba de ELISA. Se ha considerado que la obtención de resultados positivos en más de una de estas pruebas equivale a un diagnóstico definitivo de infección por *T. cruzi*. Sin embargo, una sola prueba de IFI o ELISA positiva puede ser suficiente hoy día, ya que su sensibilidad es del 99% aproximadamente, siempre que se hayan seguido procedimientos técnicos normalizados y que los reactivos se hayan sometido a controles de calidad y se hayan conservado en las condiciones prescritas. La prueba de ELISA tiene una Excelente sensibilidad y una buena especificidad. Además presenta dos ventajas principales en comparación con la inmunofluorescencia indirecta y la hemaglutinación indirecta, requiere de un espectrofotómetro que elimina la subjetividad y se puede automatizar y permite analizar simultáneamente muchas muestras (Organización Mundial de Salud, 2002).

También existen pruebas no convencionales útiles para el diagnóstico de Chagas. Las cuales están basadas en técnicas de ELISA, pero utilizan reactivos tales como proteínas recombinadas, antígenos purificados o péptidos sintéticos, creados con el fin de aumentar la especificidad del diagnóstico serológico y evitar la reactividad cruzada con otras enfermedades parasitarias, como la leishmaniasis mucocutánea y visceral. Además se utilizan nuevas matrices para inmovilizar los antígenos, tales como tiras y cuentas de colores, y de nuevas técnicas como la inmunoelectrotransferencia (Western blot) (Programa Nacional de Chagas, 2006).

Es por ello que en este estudio se evaluaron dos pruebas elaboradas en Alemania, que no han sido evaluadas en el país. El método ELISA Novatec® que se basa en la determinación inmunoenzimática cualitativa de anticuerpos específicos contra *T. cruzi*, por medio de la utilización de una fase sólida recubierta por antígenos específicos de *T. cruzi* inmovilizados y el método Inmunoblot Novatec® que permite la detección cualitativa de anticuerpos IgG anti *T. cruzi*, por medio de una membrana de nitrocelulosa impregnada con antígenos de *T. cruzi* recombinante. Para la evaluación de dichas pruebas se compararon los resultados obtenidos con el método ELISA Recombinante, utilizado como método de comparación y con sueros control.

Se consideran positivos para *T. cruzi* por el método ELISA Novatec®, las muestras con absorbancias mayores del 10% del punto de corte, determinado según indicaciones del fabricante. Por el contrario, utilizando el método Inmunoblot Novatec® fueron declarados positivos para *T. cruzi* muestras que revelaran una banda en el área "test" y en el área "control" de la tira según indica el instructivo.

Con ambos métodos se evaluaron 383 sueros colectados en diferentes áreas endémicas del país, seleccionados por conveniencia y 111 sueros control. Todos los resultados fueron clasificados como positivos, indeterminados o negativos. Los resultados obtenidos fueron comparados con los resultados esperados según el método de comparación y de los controles utilizados, posteriormente se procedió a determinar la sensibilidad y especificidad de cada método y la concordancia entre ellos.

El primer objetivo de este estudio fue determinar la especificidad y sensibilidad del método ELISA Novatec® y del método Inmunoblot Novatec®, lo cual no fue estadísticamente posible debido a que ambos métodos presentaron resultados considerados como indeterminados. La sensibilidad de una prueba es la proporción de los individuos clasificados como positivos por el método de comparación que se identifican correctamente por la prueba en estudio y para su determinación se requiere conocer los resultados que son verdaderamente positivos, el total de casos positivos y la cantidad de falsos negativos. Cuando la prueba presenta resultados indeterminados, se presenta la incertidumbre sobre si alguno de estos resultados correspondía a casos positivos o a casos negativos. Por ende si se calcula la sensibilidad de la prueba existiría el riesgo de proporcionar valores falsos por que se desconoce la verdadera identidad de estos resultados indeterminados. Lo mismo ocurre con la especificidad que se refiere a la proporción de los individuos clasificados como negativos por el método de comparación que se identifican correctamente por la prueba en estudio y que para su determinación requiere conocer los resultados que son verdaderamente negativos, el total de negativos y la cantidad de falsos positivos. Por lo tanto, para que se pueda determinar las tasas de verdaderos positivos y verdaderos negativos se requiere que los resultados se expresen solo en dos variables, en este caso positivo y negativo (Azzimonti, 2005).

El segundo objetivo fue determinar la concordancia de los dos métodos ELISA Novatec® y el método Inmunoblot Novatec®, para lo cual se determinó el índice Kappa.

Los resultados obtenidos de los sueros control con el método ELISA Novatec® permitieron calcular el índice Kappa, encontrándose que es de 0.7529 (Tabla 5), el cual según la clasificación de Landis y Koch es clasificado con buena concordancia. Es importante, recordar que la máxima concordancia posible entre dos métodos corresponde a un índice igual a 1, al ser este índice superior a 0 se descarta que la concordancia observada sea la que se espera a causa exclusivamente del azar (Cortes, Rubio, Gaitán, 2010).

Al evaluar los resultados de los 383 sueros procesados con el método de comparación con los obtenidos con el método ELISA Novatec® se encontró que el índice Kappa es de 0.9220 (Tabla 5), el cual según la clasificación de Landis y Koch es clasificado con muy buena concordancia (Cortes, Rubio, Gaitán, 2010).

Los resultados obtenidos de los sueros control con el método Inmunoblot Novatec® permitieron calcular el índice Kappa, que presenta un índice de 0.6931 (Tabla 5), el cual según la clasificación de Landis y Koch es clasificado con buena concordancia (Cortes, Rubio, Gaitán, 2010).

Al evaluar los resultados de los 383 sueros procesados con el método de comparación con los obtenidos con el método Inmunoblot Novatec® se logra calcular el índice Kappa el cual presenta un índice de 0.6103 (Tabla 7), el cual según la clasificación de Landis y Koch es clasificado con muy buena concordancia (Cortes, Rubio, Gaitán, 2010).

Los valores del índice Kappa obtenidos por tres de las comparaciones realizadas fueron clasificados según Landis y Koch con buena concordancia, aun cuando presentan variaciones significativas del índice Kappa entre ellos, como se observa en la tabla 5 de resultados. Es por ello que es importante resaltar que los rangos utilizados por Landis y Koch son muy amplios y arbitrarios, además que no consideran las características propias de cada uno de los fenómenos que se intentan medir ni la relevancia clínica que, en un momento dado, puedan adquirir las diferencias o similitudes encontradas, que son dependientes de la entidad o fenómeno a medir (Cortés, Rubio, Gaitán. 2010).

El principal problema observado en este estudio se debe a la cantidad de resultados indeterminados obtenidos por los métodos ELISA Novatec® e Inmunoblot Novatec®. Observándose la tendencia a mayor número de resultados indeterminados, el índice Kappa disminuye, lo cual provoca una disminución en la concordancia entre los resultados.

Se puede considerar que el método ELISA Novatec® resultó mejor que el método Inmunoblot Novatec®, por presentar una mejor concordancia entre los resultados, al presentar menor cantidad de resultados indeterminados. Sin mencionar que la complejidad y el tiempo por prueba es menor con el método ELISA Novatec®.

Sobre el aspecto técnico de factibilidad de los dos métodos de estudios se puede mencionar que el método ELISA Novatec®, mostró ser un método más práctico, que permite que se procesen hasta 91 muestras simultáneas en un tiempo de dos horas con treinta minutos, mientras que con el método Inmunoblot Novatec® solo se pueden procesar 7 muestras simultáneas, en un tiempo de tres horas, lo cual no es muy útil en laboratorios que manejan grandes cantidades de muestras ya que provocaría un retraso en la entrega de resultados, acumulación de muestras en el laboratorio y una situación tediosa para el personal que procese dichas muestras.

Los dos métodos de estudios presentan diferencias significativas en el tipo de antígeno que utilizan para la detección de anticuerpos anti *T. cruzi*. El método de ELISA Novatec® utiliza un antígeno de *T. cruzi* y el método Inmunoblot Novatec® utiliza un antígeno recombinante. Esto puede influir en los resultados obtenidos, ya que las pruebas que utilizan un antígeno específico suelen ser más específicas pero menos sensibles, caso contrario de lo que ocurre con las pruebas que utilizan antígenos recombinantes que presentan mayor sensibilidad (Silveira, Umezawa, Luquetti. 2001).

Actualmente se prefiere utilizar mezclas de anticuerpos recombinantes, por que incrementan la sensibilidad sin resentir la especificidad. Además es recomendable el empleo de métodos con antígenos específicos en las reacciones de tamizaje y metodología recombinante para la confirmación, aunque esta estrategia todavía no está protocolizada (Silveira, Umezawa, Luquetti. 2001).

## VIII. CONCLUSIONES

- ♣ La determinación de la especificidad y sensibilidad de los métodos en estudio, no fue estadísticamente posible debido a que ambos métodos presentaron resultados indeterminados.
- ♣ Al determinar la concordancia de ambos métodos utilizando un panel de sueros de referencia, se observó que el método ELISA Novatec® presentó mejor concordancia que el método Inmunoblot Novatec®.

## IX. RECOMENDACIONES

- ♣ La evaluación de los diferentes reactivos disponibles en el mercado antes de su venta debería ser una norma general que dictamine el Ministerio de Salud Pública.
- ♣ Realizar estudios que incluyan sueros con títulos bajos de anticuerpos como controles positivos bajos para una posterior estandarización de la concentración antigénica de la prueba.
- ♣ Fomentar los estudios basados en la producción de técnicas diagnósticas con antígenos nativos y recombinantes, con las que la Universidad de San Carlos y sus Unidades puedan convertirse en centros de investigación y desarrollo.



## X. REFERENCIAS

- Abecerril, M. Pérez, V. Noguez, J. Palafox, J. (2010). *Riesgo de Transmisión de Trypanosoma cruzi en el Municipio de Metztlán, Estado de Hidalgo, México, Mediante la Caracterización de Unidades Domiciliares y sus Índices Entomológicos*. *Public Health Neotropical Entomology*, 39 (5)
- Aguilar, F. (1993). *Historia de la Enfermedad de Chagas en Guatemala. Enfermedades Tropicales en Guatemala 93 Informe anual Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA)*.
- Arrieta, R. Cañabate, C. Castro, E. Gascon, J. Madoz, P. Puente, S. Sauleda S. Vesga M. (2009). *Enfermedad de Chagas y donación de sangre. España: Ministerio de Sanidad y Política Social*. Recuperado: 2013, 05 de septiembre. Disponible en: <http://www.mssi.gob.es/profesionales/saludPublica/medicinaTransfusional/publicaciones/docs/informeChagasJulio09.pdf>
- Asociación de Lucha contra el Mal de Chagas. (2004). *Enfermedad de Chagas-Mazza*. Argentina. Recuperado: 2013, 12 de mayo. Disponible en: [http://www.alcha.org.ar/Articulos/chagas\\_enfermedad.pdf](http://www.alcha.org.ar/Articulos/chagas_enfermedad.pdf)
- Ayau, O. (1999). *Enfermedad de Chagas*. Guatemala: Editorial impresos Litográficos.
- Azzimonti, J. (2005). *La concordancia entre dos tests clínicos para casos binarios: problemas y solución*. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 39 (4)
- Berganza, E. (2010). *Situación Epidemiológica de la Enfermedad de Chagas, Área de Salud de Jutiapa*. Guatemala.
- Berganza, E. (2011). *Seroprevalencia de infección de Trypanosoma cruzi en gestantes usuarias de los servicios de salud, en municipios endémicos de Jutiapa, Guatemala*. Jutiapa. Universidad del Valle de Guatemala. Facultad de Ciencia y Humanidades. Recuperado: 2013, 14 de julio. Disponible en: [http://www.acervosalud.net/attachments/article/75/2011\\_EBerganza\\_Seroprevalencia%20de%20infecci%C3%83%C2%B3n%20de%20T%20cruzi%20en%20gestantes%20Jutiapa%20Guatemala%202008.pdf](http://www.acervosalud.net/attachments/article/75/2011_EBerganza_Seroprevalencia%20de%20infecci%C3%83%C2%B3n%20de%20T%20cruzi%20en%20gestantes%20Jutiapa%20Guatemala%202008.pdf)
- Blanco, S. (1943). *Contribución al estudio de los Redúvidos hematofagos de Guatemala*. Tesis de Medicina. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.

- Blanco, S. Segura, E. Gürtler, R. (2003). *El control de la transmisión congénita de Trypanosoma cruzi en la Argentina*. Argentina: Revista de Medicina (Buenos Aires) 59(2)
- Blejer J, Valle, E. (2002). *Riesgo de transmisión de infecciones por vía transfusional*. Revista de Medicina. 62 (3).
- Bloch, M. (1982). *Trypanosomiasis Americana Fase Aguda*. Revista Medicina Tropical, 2(78).
- Breniere S, Britto, C. Yaksic, N. (1994) *Transmition transplacentaire de antibody anti-Trypanosoma cruz*. Entrevista medica. 21(3).
- Castillo, AL., Matta, VL., Cáceres, A. (1986). *Seroepidemiología de la Enfermedad de Chagas en el Suroriente de Guatemala*. Memorias: Tercer Congreso Nacional de Microbiología, Guatemala.
- Cedillos, R Romero, J. Ramos, H. Sasagawa. E. (2011). *La enfermedad de Chagas en El Salvador evolución histórica y desafío para el control. Iniciativa de los países de centro america para la interrupción de la transmisión vectorial y transfusional de la enfermedad de chagas (IPCA)*. Salvador. Recuperado: 2013, 14 de julio. Disponible en:[http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:kP8P5Jpu1i0J:www.paho.org/els/index.php%3Fgid%3D480%26option%3Dcom\\_docman%26task%3Ddoc\\_download+%amp;cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=mx](http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:kP8P5Jpu1i0J:www.paho.org/els/index.php%3Fgid%3D480%26option%3Dcom_docman%26task%3Ddoc_download+%amp;cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=mx)
- Cordon, C. Pennington, P. (2004). *Eco-epidemiología de la transmisión vectorial de la enfermedad de chagas en Guatemala*. Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala: Revista universitaria 16 (1)
- De León M, Matta V. (1997). *Estudio clínico, serológico y epidemiológico de la enfermedad de Chagas en Santa María Ixhuatán, Santa Rosa*. Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Delgado, P. (1999). *Estudio clínico epidemiológico, serológico y molecular de una población de pacientes con diagnóstico presuntivo de miocardiopatía Chagásica*. Tesis de maestría en Microbiología. Universidad de los Andes. Colombia.

- Guhl, F. (2000). *Control de enfermedades de Chagas. En: Universidad Simón Bolívar, Organización Panamericana de Salud, Sociedad Mexicana de Parasitología editores. Memorias, Primer Encuentro Internacional sobre la Enfermedad de Chagas en México.* México, D.F.: Facultad de Medicina, UNAM,
- Guhl, F. (2009). Enfermedad de Chagas: Realidad y perspectivas. *Revista Biomedica* 20:228-234
- Guhl, F. LAZDINS-HELDS, J, 2007. Grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. Argentina. Programa Especial de Investigaciones y Enseñanzas sobre Enfermedades Tropicales (TDR), patrocinado por U N I C E F / P N U D / B a n c o M u n d i a l / O M S. Recuperado: 2013, 26 de septiembre. Disponible en: [http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/TDR\\_SWG\\_09\\_spa.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/TDR_SWG_09_spa.pdf)
- Hayes, R. (1990). *Estimación de las tasas de incidencia en infecciones y parásitos crónicos a partir de enfermedad de Chagas en América Latina. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana.*
- Iniciativa de Bienes Públicos Regionales. Programa regional para el control de la enfermedad de chagas e América latina Recuperado: 2013, 15 de julio. Disponible en: [www.paho.org/.../index.php?option=com\\_docman&task=doc.pdf](http://www.paho.org/.../index.php?option=com_docman&task=doc.pdf)
- Kropf, S. Massaran, L. (1997). *Carlos Chagas, La ciencia para combatir enfermedades tropicales.* Recuperado: 2013, 03 de septiembre. Disponible en: [http://www.museudavida.fiocruz.br/media/cartilha\\_chagas\\_espanhol\\_site.pdf](http://www.museudavida.fiocruz.br/media/cartilha_chagas_espanhol_site.pdf)
- Labarthe, D. (1991). *Control of Chagas Disease.* Geneva. World Health Organization: Switzerland.
- Landfear S. Ignatushchenko M. (2001). The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Molecular and Biochemical Parasitology.* Oregon Health Sciences University. USA.
- Matta VL. (1994) *Avances en el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas en Guatemala.* Enfermedades Tropicales en Guatemala 94 Informe Anual Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA). Guatemala.
- Mazariegos L. (1986). *Prevalencia de enfermedad de Chagas en donadores de Banco de Sangre.* Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.

- Mekelt, G. (1983). *La Epidemiología de la Enfermedad de Chagas en relación con el ecosistema domiciliario*.  
*Revista: Conarec. 14 (46)*
- Ministerio de Salud Pública y Asistencia social. *Homenaje al cincuentenario del descubrimiento de la enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis Americana) 1,909-1,959*. Guatemala: Instituto de Enfermedades Tropicales "Doctor Rodolfo Robles".
- Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. (2005). *Manual de Diagnóstico y Atención para la Enfermedad de Chagas*. Guatemala. Recuperado: 2014, 24 de marzo. Disponible en: [chagasecosalud.censalud.ues.edu.sv/.../3-manuales.html](http://chagasecosalud.censalud.ues.edu.sv/.../3-manuales.html)
- Ministerio de salud y Subsecretaría de Salud Pública. (2011). *Guía de Diagnóstico, Tratamiento y Prevención de la Enfermedad de Chagas*". Chile.
- Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. (2010). *Guías de Diagnóstico, Tratamiento y Prevención de la Enfermedad de Chagas*". Santiago, Chile.
- Montenegro, M. (1943). *Contribución a estudio de la Tripanosomiasis en Guatemala*. Tesis de investidura. Facultad de Medicina. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Monroy, C., Mejía, M., Rodas, A., Tabaru, Y. (1996). Resultados Preliminares de la situación actual de la distribución de vectores de la Enfermedad de Chagas a nivel nacional: Informe Anual No.5 (GJET -106) del proyecto de cooperación Guatemala-Japón para la investigación de Enfermedades Tropicales JICA.
- Monroy, M. (1986). *Memorias. VIII Congreso Latinoamericano. Parasitemia*. Guatemala.
- Monroy, C. Rodas, A. Mejía, M. Rosales, R. Tabaru, Y. (2003). *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, Volumen. 98(3)
- Moya P, Moretti E. (1997). *Enfermedad de Chagas congénita. Clínica y terapéutica de Enfermedad de Chagas*. Revista: Edición Fiocruz. Argentina

- Muñoz P, et al. (1992). *Enfermedad de Chagas congénita sintomática en recién nacidos y lactantes. Revista Chilena de Pediatría. Chile. Volumen 63 (4)*
- Nakagawa, J. (2000–2002). Informe de progreso: Proyecto de Control de los Vectores de Chagas. República de Guatemala. Guatemala.
- OPS/OMS. (1998). *Tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas. Conclusiones de una consulta técnica. Rio de Janeiro, Brasil, Organización Panamericana de la Salud Enfermedad de Chagas. Boletín Epidemiológico. 3:1-5*
- Organización Panamericana de la Salud. (1984). Aspecto Clínico de la Enfermedad de Chagas. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana. 77*
- Organización Panamericana de la Salud. (1992). Enfermedad de Chagas. *Boletín Epidemiológico. Volumen 2.*
- OPS/MS. (2001). Informe de la IV Reunión de la Comisión Intergubernamental de la Iniciativa de Centro América, Ciudad de Panamá.
- Organización Panamericana de la Salud. (2005). Estimación cuantitativa de la Enfermedad de chagas en las Américas. Recuperado: 2014, 24 de marzo. Disponible en: <http://www.bvsops.org.uy/pdf/chagas19.pdf>
- Orozco, M. (2009). Situación de la Enfermedad de Chagas en Guatemala *enero - junio, 2009*. Centro Nacional de Epidemiología, Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. [Publicación en línea]. Recuperado: 2013, 18 noviembre. Disponible en: <http://epidemiologia.mspas.gob.gt/vigepi/Chagas%20enero-junio-09.pdf>.
- Parslow, T., Suites, D., Terr, A., Imboden, J. (2002). *Inmunología básica y clínica*. México: Rebtet GA. Traducido por: El manual moderno.
- Paz, M. Ortega, L. (1994) Valor Predictivo de las Pruebas Serológicas para el Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. *Enfermedades Tropicales en Guatemala 94 Informe Anual Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA)*.

- Pherson, P., Wahlgren, M. (1982). Intracranial Classifications probably due to congenital Chagas Disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*.
- Pinto J. (1992). *Epidemiology of Chagas' disease*. [In Wendel S., et al *Chagas' disease (American Trypanosomiasis); its impact on transfusion and clinical medicine*]. Brasil; International Society of Blood Transfusion.
- Pinto J. (1985). *Historia Natural*. En: *Cardiopatía Chagásica*. Editado por: J. Romeu Cancado y M. Chuster. Fundación Carlos Chagas. Belo Horizonte, MG, Brasil.
- Ponce R, et al. (1996). *Estudio del Sistema Nervioso Autónomo Cardiovascular en la Enfermedad de Chagas en etapa crónica indeterminada*. *Archivo Medico*.
- Rassi, A., Rassi, A., Little, W, Sérgio, S, Sérgio, G., Rassi, M.D., Alexandre, G. et al. (2006). Development and validation of a simple risk score for predicting mortality in Chagas'heart disease. *New England Journal of Medicine*.
- Rodríguez, M. (2000). Riesgo de transmisión de la enfermedad de Chagas Laboratorio de Parasitología y Micología del Centro de Investigaciones Regionales. Universidad Autónoma de Yucatán. Centro Estatal de la Transfusión Sanguínea, S.S.A., Mérida, Yucatán, México.
- Salazar, P. y Marín, R. (2006). *Manual para el diagnostico de la infección por Trypanosoma cruzi*. México. Recuperado: 2013, 03 junio. Disponible en: [http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:oF6UObU26CQJ:http://www.paho.org/mex/index.php%3Foption%3Dcom\\_docman%26task%3Ddoc\\_download%26gid%3D32%26Itemid%3D329%2BSalazar,++Manual+para+el+diagnostico+de+la+infecci%C3%B3n+por+Trypanosoma+cruzi.+M%C3%A9xico.&hl=es&rlz=1T4NDKB\\_esGT527GT527&ct=clnk](http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:oF6UObU26CQJ:http://www.paho.org/mex/index.php%3Foption%3Dcom_docman%26task%3Ddoc_download%26gid%3D32%26Itemid%3D329%2BSalazar,++Manual+para+el+diagnostico+de+la+infecci%C3%B3n+por+Trypanosoma+cruzi.+M%C3%A9xico.&hl=es&rlz=1T4NDKB_esGT527GT527&ct=clnk)
- Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública. 2001. Protocolo para la vigilancia en salud pública de chagas. Colombia. INT-R02.001.4020-001
- Souza, R., Santos, M., Lima, F., El-Stayed, N. Myler, P., Ruiz, J. Silveira, J. (2007). New *Tripanosoma cruzi* repeated element that shows sidespecificity for insertion. *Eukaryol cell*,
- Tijssen P. (1,985). *Practice and theory of enzyme inmunoassay*. New Cork. Elsevier

Tercero, C. Iraheta, M., Motta, R., Argueta, J., Kaneko, S. (1995). Amastigotes de *T. cruzi* en placentas de recién nacidos con enfermedad de Chagas congénita. Proyecto de cooperación Guatemala Japon JICA para la Investigación de enfermedades tropicales.

Trillo, U. Garces, J. y Gris, M. (2008). *Enfermedad de Chagas: una enfermedad emergente en nuestro medio. Revista Española de Anestesiología y Reanimación*. España.

Valdespino J. (1994) *Enfermedades Tropicales en México; Diagnóstico, Tratamiento y Distribución geográfica*. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico. Secretaría de Salud.

Vega S., Naquira, C. (2006) *Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la Tripanosomiasis americana (Enfermedad de Chagas)* Instituto Nacional de Salud.

Velásquez, E. Sosa, S. Segura, E. Ruiz, M. Porcel, B. Yampostis C. (1993). *Caracterización Clínica de la Enfermedad de Chagas en Guatemala. Informe Preliminar. Documento Mimeografiado*.

Vissoci E, (1998). Evaluation of the Western blot in the confirmatory serologic diagnosis of Chagas' Disease. *Revista Medica*. 59:7

World Health Organization. 2010. *Trypanosoma cruzi* assays: operational characteristics. Report. 1. Diagnostics and Laboratory Technology. Disponible en: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75844/1/9789241500296\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75844/1/9789241500296_eng.pdf?ua=1)

Yves, C. (2004). Chagas Disease American Trypanosomiasis. Medicine.com.Inc. *Revista Sociedad Brasileira de Medicina Tropical*. 37:2

Melanie Verena Gramajo López

**Autora**

Eugenia Raquel González Aldana

**Autora**

MSc. Vivian Matta

**Asesora**

Licda. Karla Lange

**Asesora**

M. A. Maria Eugenia Paredes

**Revisora**

M. A. Maria Eugenia Paredes

**Directora**

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda

**Decano**