

Moneda, María Sol de la

Verificación de la sensibilidad y especificidad de las metodologías utilizadas para el diagnóstico de Chagas en muestras del HEC

2022

Instituto: Ciencias de la Salud

Carrera: Bioquímica



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución 4.0
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Documento descargado de RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital de la Universidad Nacional Arturo Jauretche

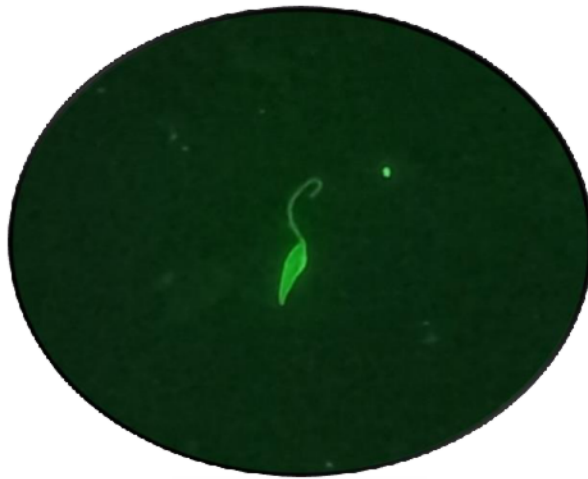
Cita recomendada:

Moneda, M. S. de la (2022) *Verificación de la sensibilidad y especificidad de las metodologías utilizadas para el diagnóstico de Chagas en muestras del HEC* [tesis de grado Universidad Nacional Arturo Jauretche]

Disponible en RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital UNAJ <https://biblioteca.unaj.edu.ar/rid-unaj-repositorio-institucional-digital-unaj>

Instituto de Ciencias de la Salud
Trabajo Final de la Carrera de Bioquímica

*Verificación de la sensibilidad y especificidad de las metodologías
utilizadas para el diagnóstico de Chagas en muestras del HEC*



Alumna: de la Moneda, María Sol.

Directora: Dra. VILLAGRA, Andrea Patricia Magdalena (Bioquímica), Docente de BCII y Profesor Asociado de Microbiología Clínica para la carrera de Bioquímica, ICS, UNAJ – Coordinadora de Preanalítica y Postanalítica y Responsable de la Calidad en el Servicio de Laboratorio del Hospital de Alta Complejidad en Red “El Cruce Dr. Néstor C. Kirchner” (HEC).

Legajo: 12197.

Lugar de Trabajo: Hospital de Alta Complejidad El Cruce – Néstor Kirchner (HEC).

Fecha de Entrega: 18 de Marzo de 2022.

Índice

Agradecimientos.....	3
Abreviaturas.....	4
Introducción e Importancia del Tema.....	6
1. Marco teórico.....	6
2. El parásito y su transmisión.....	9
3. Características del insecto vector	12
4. Fases de la infección por <i>T. cruzi</i>	14
4.1. Fase aguda	14
4.2. Fase crónica.....	16
5. Métodos Diagnósticos	17
5.1. Determinaciones en Fase Aguda	18
5.2. Determinaciones en Fase Crónica	19
6. Embarazo	22
Objetivos.....	23
Objetivo General.....	23
Objetivos Específicos.....	24
Materiales y Métodos	24
1. Procesamiento de muestras.....	24
1.1. Test inmunocromatográfico	24
1.2. Inmunoanálisis	26
1.3. IFI.....	27
2. Muestras discordantes: Procesamiento por un tercer método	34
3. Sensibilidad y especificidad	35
4. Análisis de Datos	36
Resultados.....	37
Discusión	42
Conclusión.....	43
Referencias Bibliográficas.....	45

Agradecimientos

Al concluir esta etapa de mi vida, me tomo el tiempo para agradecer a todas aquellas personas que hicieron esto posible y que, con su apoyo, lograron que cada paso sea con fuerza, dedicación y profesionalismo.

En primer lugar, debo darle infinitas gracias a mi directora, la Dra. Andrea Villagra, que con su excepcional dedicación, apoyo, paciencia, comprensión, aliento y vocación hicieron que cada paso sea real, me inspiró y demostró que estoy donde quiero estar.

A mi querida UNAJ y todos los profesionales que en ella trabajan con tanta calidez que te hacen sentir en casa. Todos los formadores de la carrera se merecen mi gratitud, ya que con cada enseñanza y consejo te orientan a cada día, te adentran desde su materia a la mesada de trabajo y te ofrecen siempre el apoyo que uno necesita.

A las personas que hicieron esto factible, a la Dra. Stella Loudet jefa del servicio de laboratorio del Hospital “El Cruce” que me proporcionó el lugar donde poder realizar mis prácticas; a la Dra. Cristina G. Maidana jefa del departamento de producción del INP “Dr. Mario Fatala Chaben” y al Hospital Británico que me proporcionaron los materiales necesarios; a las doctoras Marta Ruiz Diaz y Amalia Schiel del área de IF del HEC que con sus conocimientos y amplia experiencia en el campo lograron guiarme para obtener resultados fructíferos; y a todos los integrantes del laboratorio que siempre tuvieron buena predisposición y palabras de aliento.

Doy gracias inmensas por haber conocido personas maravillosas en el transcurso de esta carrera, compañeros que terminaron siendo amigos. Así como también a mis amigos de la vida, los que me comprendieron y me ayudaron a distraerme y reír cada vez que lo necesité, acompañándome con cada paso.

A mi jefa de laboratorio, la Bq. Denise Hernández por proporcionarme los días necesarios para estudiar o rendir y a mi compañera y amiga la Tec. Romina García por proveerme la plataforma con la cual pude realizar la confirmación de datos de todos los pacientes y por siempre estar retándome cuando quería procrastinar e incentivándome a seguir.

Finalmente, pero para nada menos importante, a mi familia. A mi mamá que siempre estuvo, que es mi pilar y fortaleza, que me acompañó siempre, se preocupaba por mi falta de sueño y me daba las palabras justas cuando lo necesité. A mi pareja, que, sin él, el camino hubiese sido más difícil y en particular, a mi abuela, que está en el cielo, pero sé que siempre me acompañó en cada paso y siempre estará en mi mente con su hermosa sonrisa y junto a mi corazón, literal. Los amo a todos.

Abreviaturas

Ac.: Anticuerpos.

ACV: Accidente Cerebro Vascular.

Ag.: Antígenos.

CABA: Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

CAPS: Centro de Atención Primaria de la Salud.

CMIA: Inmunoanálisis Quimioluminiscente de Micropartículas.

CONICET: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

Dr.: Doctor.

EDTA 3K: Acido Etilen-Diamino-Tetracético Tripotásico.

ELISA: del inglés Enzyme-linked Immunosorbent Assay, es decir, Ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas.

FBA: Fundación Bioquímica Argentina.

FITC: del inglés Fluorescein IsoTioCyanate, es decir, Isotiocianato de fluoresceína.

HAI: Hemoaglutinación Indirecta.

HEC: Hospital de Alta Complejidad El Cruce – Néstor Kirchner.

ICT: Inmuncromatografía.

IF: Inmunofluorescencia.

IFI: Inmunofluorescencia Indirecta.

Igs.: Inmunoglobulinas.

IgG: Inmunoglobulina G.

IgM: Inmunoglobulina M.

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PBS: del inglés Phosphate Buffered Saline, es decir, Buffer fosfato salino.

PEEC: Programa de Evaluación Externa de la Calidad de la FBA.

Px.: Paciente.

Rdo.: Resultado.

SNC: Sistema Nervioso Central.

URL: Unidades Relativas de Luz.

Resumen

La Tripanosomiasis americana o mejor conocida como Enfermedad de Chagas es una patología generada por un parásito hemoflagelado que de forma obligada, se encuentra dentro de sus hospedadores triatominos (mejor conocido como vinchuca, en Argentina) y mamíferos, como el ser humano, denominado *Trypanosoma cruzi* en honor al maestro de su descubridor, el Dr. Oswaldo Cruz.¹ Su forma de transmisión principal, a partir de la cual se describe su ciclo de vida, es la vectorial como consecuencia de la materia fecal infectada de su vector, pero no es la única. También puede transmitirse de forma vertical (siendo ésta la de mayor prevalencia en la actualidad provocando 10 veces más casos de infección¹⁰), transfusión de sangre infectada, trasplante de órganos, ingesta de parásitos o accidente de laboratorio.

En nuestro país, la enfermedad es endémica y dependiendo del control del vector, fueron clasificadas las provincias según los niveles de riesgo. Existen más de un millón y medio de personas infectadas y más de 7 millones expuestas, presentándose un 70% como portadores asintomáticos generando 1.400 nacimientos de niños infectados por año. Las dos principales leyes que rigen en Argentina son la 26.281⁴ y 26.279 donde se expresa el control de la transmisión y la obligatoriedad del diagnóstico en mujeres embarazadas y sus hijos.

Debido a que se trata de una enfermedad desatendida, con tratamiento efectivo que provoca la disminución de los títulos e incluso su cura y a que las patologías que genera en el 30% de los pacientes⁷, el diagnóstico oportuno con metodologías sensibles y específicas es de gran necesidad. Por este motivo, el objetivo del presente trabajo fue de verificar los parámetros de validez de las técnicas diagnósticas del HEC, siendo éstas la ICT y el CMIA frente al método de confirmación, la IFI y así determinar la frecuencia de chagas reactivo de todas las muestras derivadas y remitidas por el hospital.

Fueron procesadas 178 muestras por medio de las tres técnicas mencionadas, arrojando que el 5,06% dieron resultado reactivo, de las cuales el 77,78% pertenecía a pacientes femeninas y el 85,71% son oriundas de la localidad de Florencio Varela y una de ellas se encontraba embarazada. Finalmente, la sensibilidad del CMIA fue de 73,33% mayor que el de la ICT con 66,67% y la especificidad fue mayor en la ICT con 99,39% frente a 98,16% del CMIA. Valores que no fueron concordantes con los enunciados por el fabricante.

Introducción e Importancia del Tema

1. Marco teórico

Hace más de 100 años el Dr. Carlos Ribeiro Justiniano Das Chagas descubrió al agente causal de la enfermedad que lleva su apellido durante el estudio del paludismo en Lassance, Brasil. Interesado en insectos hematófagos, halló en el tubo digestivo de barbeiros (nombre con el que se conoce a los triatomíneos en dicho país) un parásito denominado y actualmente conocido como *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) en honor a su maestro, el Dr. Oswaldo Cruz. (CONICET, 2015)¹

En nuestro país, el Dr. Salvador Mazza fue quien a partir de 1926 retomó las investigaciones y revalorizó los trabajos científicos del Dr. Chagas demostrando la existencia de enfermos con la conocida Tripanosomiasis americana mediante el hallazgo de *T. cruzi* en muestras sanguíneas. (Belaunzarán, 2015)² El hecho de ser conocida como “americana” radica en el origen de la afección, ya que es endémica en 21 países de las Américas (*Ver imagen 1*) donde se estima una incidencia anual entre 28.000 y 30.000 casos vectoriales, más 8.000 casos por transmisión congénita, afectando un total de 6 millones de personas y teniendo en cuenta que 70 millones de personas se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad de las cuales, entre el 20% y 30% desarrollan lesiones ya sean cardíacas o digestivas como consecuencia de la afección. (OPS, 2018)³

La magnitud de las cifras alerta, pero se debe tener en cuenta que las mismas no reflejan las dimensiones del problema ya que por un lado, se encuentran subestimadas por la falta de recopilación, integración y actualización de los datos y por otro lado, no se trata solamente de la forma de adquisición de la enfermedad y sus consecuencias, sino también, del acceso al sistema de atención médica, que el mismo posea las herramientas diagnósticas necesarias, de la educación y concientización de la población, de las políticas regionales, del cumplimiento de las medidas de prevención en el total de las viviendas afectadas, etc. Es decir, es una enfermedad compleja en lo que respecta a la salud socioambiental en la que se deben tener en cuenta tanto aspectos biomédicos (el parásito, el insecto que lo transmite, sus otras formas de transmisión, manifestaciones, diagnóstico y tratamiento), epidemiológicos (prevalencia, incidencia, distribución, entre otros), socioculturales y políticos (gestión en el ámbito sanitario, educativo y legislativo).

Ésta patología “olvidada”, “naturalizada” por la población que se encuentra en las zonas de riesgo y caracterizada muchas veces de forma discriminatoria, genera que en nuestro

país exista más de un millón y medio de personas infectadas que representa a 4 de cada 100 habitantes, más de 7 millones expuestas, que 3 de cada 10 personas infectadas manifiesten la enfermedad mientras que el resto permanecen como portadores asintomáticos y respecto a embarazadas se estimó en 2010 que al menos 5 de cada 100 mujeres son portadoras, generando 1.400 nacimientos por año de niños y niñas infectados/as.¹

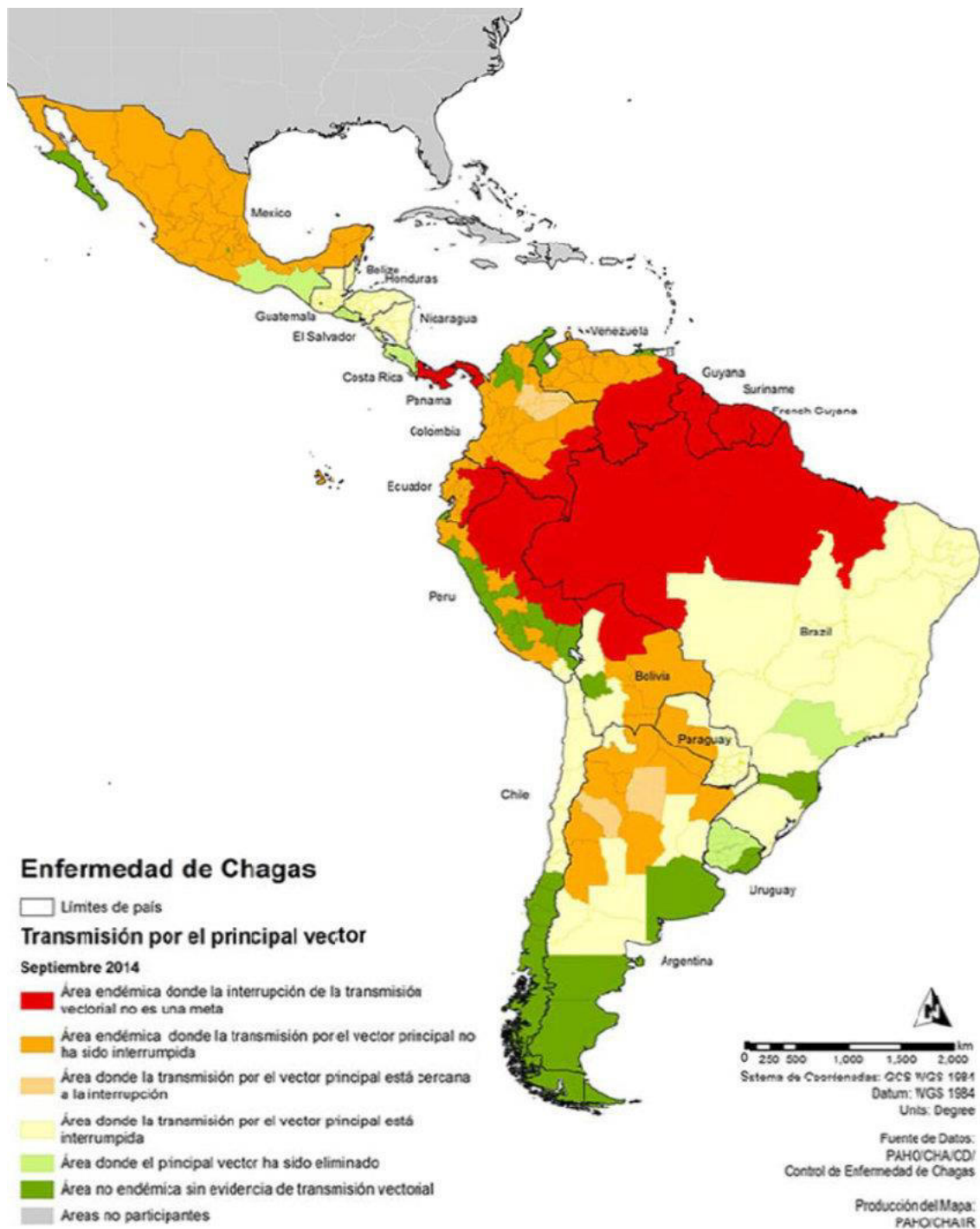


Imagen 1: Mapa de transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas (2014)

Fuente: <https://www.paho.org/es/node/49722>

En Argentina, la enfermedad es endémica, pero en las provincias los riesgos de contraer la patología por vía vectorial se encuentran en diferentes niveles de riesgo. Como se puede observar en la *Imagen 1*, las provincias donde la transmisión por el vector no ha sido interrumpida son Salta, Catamarca, Tucumán, Formosa, Chaco, Corrientes, Córdoba, Mendoza y San Juan, las cuales se consideran de alto riesgo; las provincias donde la transmisión por el vector se encuentra cercana a la interrupción son La Rioja y Santiago del Estero, las cuales se consideran de mediano riesgo; las provincias donde la transmisión por el vector se encuentra interrumpida son Jujuy, Santa Fe, Entre Ríos, San Luis, La Pampa y Río Negro siendo consideradas de bajo riesgo; y finalmente, aquellas provincias donde no hay evidencia de transmisión vectorial son las consideradas sin riesgo, siendo Buenos Aires, Chubut, Santa Cruz y Tierra del Fuego.

Estos niveles de riesgo se lograron gracias a que a lo largo de la historia de nuestro país se fueron desarrollando Leyes, Decretos y Resoluciones respecto al diagnóstico, tratamiento y prevención de la enfermedad de Chagas (*Ver imagen 2*). Las dos Leyes fundamentales en la actualidad son la **26.281** y **26.279** sancionadas en 2007. La primera mencionada, derogó la 22.360 donde, entre otras cosas, se emitía obligatoriedad del análisis de Chagas en los exámenes de ingreso laboral, lo cual provocaba amplia discriminación y a partir de 2007 y reafirmando en 2010 con la Resolución Nro. 37/10 de la Superintendencia de Riesgos de Trabajo establece que queda excluida de los exámenes preocupacionales los estudios para su diagnóstico.

En la Ley 26.281 además, se expresa un listado de normas que deben ser aplicables en todo el país para “...desarrollar intervenciones que permitan dar respuestas preventivas y de tratamiento de índole ambiental, laboral, sanitaria, educativa y de vivienda y hábitat saludable...”(Poder Legislativo Nacional (P.L.N), 2007)⁴ además de la obligatoriedad del diagnóstico tanto en todas las mujeres embarazadas como sus hijos menores de 14 años en caso de encontrarse infectadas, así como también los controles serológicos en donantes y receptores de órganos.

Por otro lado, en la Ley 26.279 se establece la obligación de la incorporación como prestaciones, a las necesarias para el diagnóstico de todo niño recién nacido de fenilcetonuria (FCU), hipotiroidismo neonatal (HC), fibrosis quística (FQ), galactosemia (G), hiperplasia suprarrenal congénita (HSC), deficiencia de biotinidasa (BTD), retinopatía del prematuro (ROP), **chagas** y sífilis.

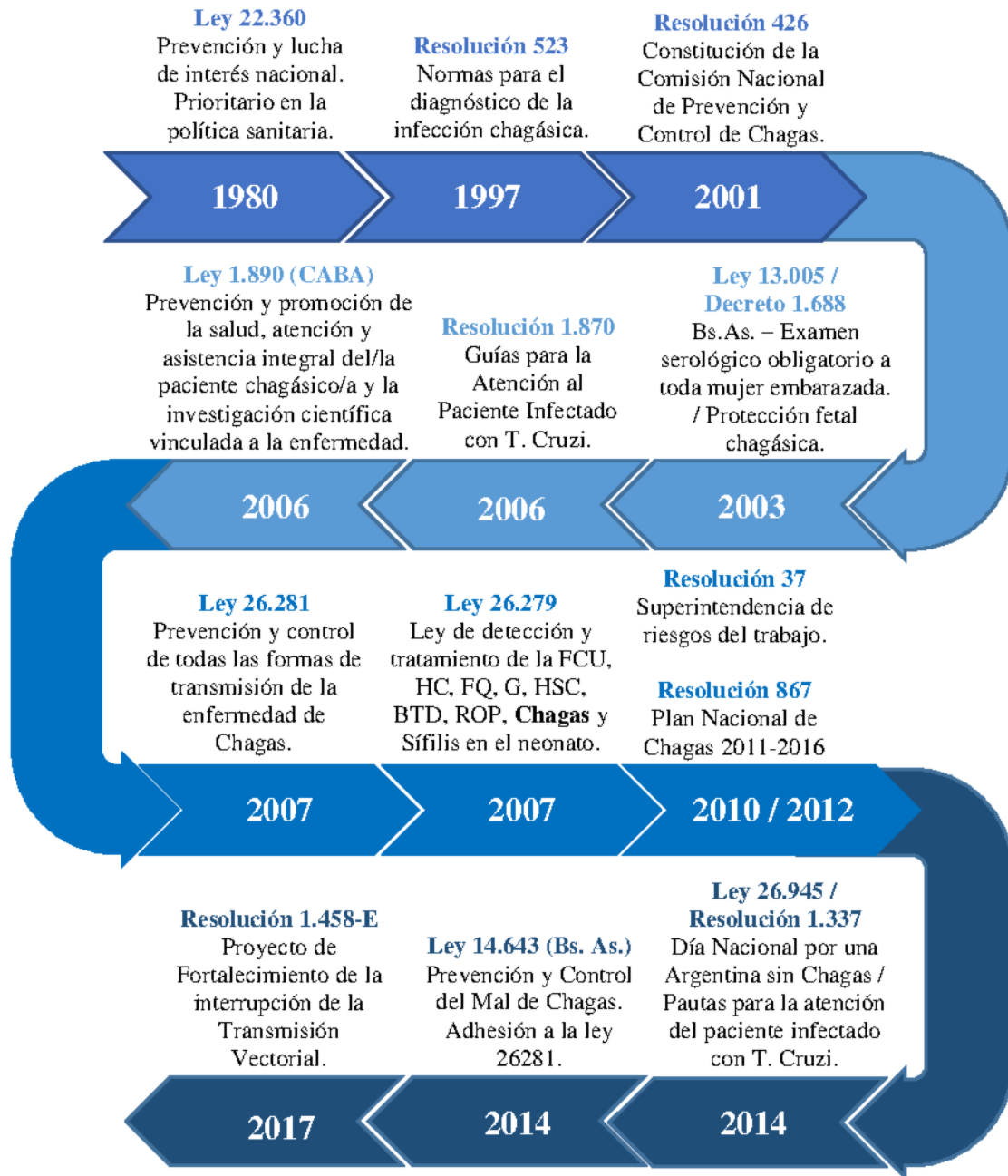


Imagen 2: Línea de tiempo de Leyes, Resoluciones y Decretos a nivel Nacional, de CABA y la Provincia de Buenos Aires.

Fuente de información: <http://www.legislaud.gov.ar/atlas/categorias/chagas.html>

2. El parásito y su transmisión

Como ya se ha mencionado, la Enfermedad de Chagas es una patología producida por el *Trypanosoma cruzi*, un parásito protozoario hemoflagelado que pertenece a la familia Trypanosomatidae. Este microorganismo de forma obligada, se encuentra dentro de sus hospedadores que son los insectos triatominos y los mamíferos, incluido el ser humano,

a partir de los cuales genera su ciclo biológico (Ver imagen 3)⁵. Comenzando el ciclo a partir del insecto triatomino, luego de alimentarse con sangre infectada con *T. cruzi* en su forma *trypomastigota*, al llegar al estómago se diferencian en *epimastigotes*, caracterizados por un cinetoplasto cerca y anterior al núcleo y una membrana levemente ondulante, donde se multiplican infectando al vector (Ver imagen 4). En el intestino posterior, el parásito cambia de estadio a *trypomastigota* nuevamente, su forma infectante, caracterizada por su estructura alargada con cinetoplasto posterior al núcleo y un flagelo que forma una extensa membrana ondulante liberada en la parte anterior de la célula. Es así, que el insecto se vuelve infectante luego de 10 a 30 días, por lo que se denomina vector.

Posteriormente, cuando el nuevo vector pica para alimentarse con la sangre, generalmente en zonas expuestas como la cara y las manos, inevitablemente deposita sus heces infectadas a pocos milímetros de la herida y el huésped instintivamente se rascará la en la zona afectada generando el ingreso de los parásitos en el organismo o bien, por medio de autoinoculación en las mucosas o lesiones de piel expuestas.

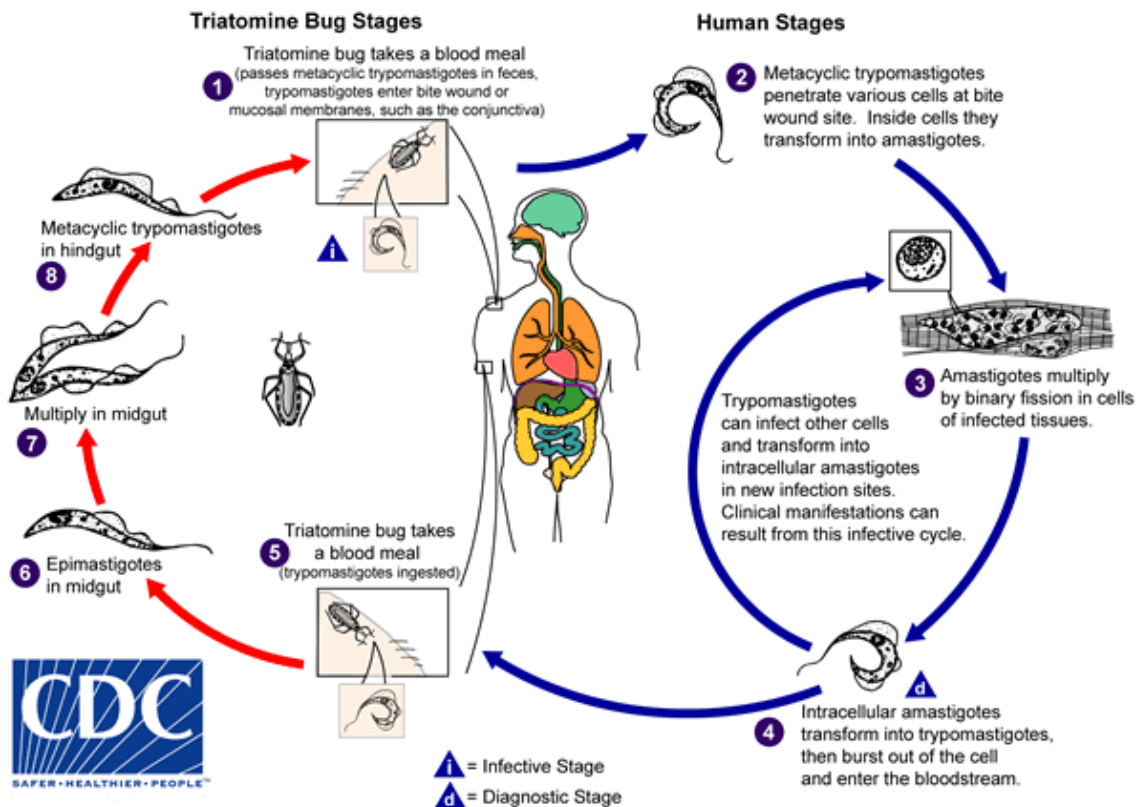


Imagen 3: Ciclo de Vida del *T. cruzi*.

Fuente: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>

Así, el *trypomastigote* circula siendo arrastrado por el torrente sanguíneo e impulsándose con el flagelo invadiendo las células cercanas, sitio en el cual se diferencian en *amastigotes*, una forma redondeada y sin flagelo que se divide por fisión binaria hasta adquirir nuevamente a su forma *trypomastigote* que genera un aumento de volumen provocando la ruptura celular y su diseminación por todo el organismo accediendo a otros tejidos, generando nuevos sitios de infección y ciclos de división, estableciendo daños en los órganos como el corazón y el aparato digestivo.

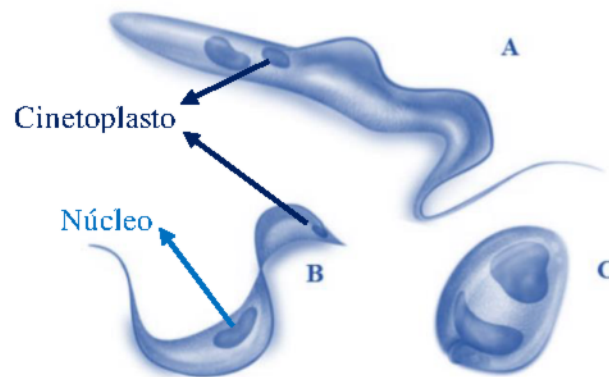


Imagen 4: Formas principales del *T. cruzi*, (A) epimastigote, (B) trypomastigote, (C) amastigote. (Pereyra, 2018)⁷

Ahora bien, el ciclo de vida recién explicado hace referencia a la **Transmisión Vectorial**, donde se deben tener en cuenta las características de los insectos vectores, que serán explicadas más adelante en éste mismo trabajo final y que no solo puede sucederle al ser humano, sino también a otros huéspedes vertebrados salvajes (como armadillos, roedores) o domésticos (como perros y gatos). (Cuba e Hidalgo, 2010)⁷ Pero no es la única vía, se pueden enlistar otras cinco formas de transmisión a las cuales se las denomina en conjunto **no vectoriales**:

- ✚ Transmisión vertical: de la madre infectada al hijo durante el embarazo. En general amamantar no genera ningún riesgo a menos que haya sangre en la leche materna.
- ✚ Transfusión de sangre infectada. En Argentina, como ya se mencionó, por ley la sangre de los donantes debe ser evaluada.
- ✚ Trasplante de órganos de un donante infectado que no pueda ser previamente tratado. La presencia de serología positiva para Chagas no contraindica el trasplante.

- ✚ Ingesta de parásitos por medio de alimentos contaminados con las heces del vector. (Aún no se han demostrado casos por esta vía en nuestro país)
- ✚ Accidente de laboratorio.

En este apartado, cabe mencionar que los mecanismos por los cuales el parásito genera los daños aún no se han establecido con claridad, pero se han propuesto tres teorías (Valdi, 2020)⁹:

- I. Daño directo: provocado como su nombre lo indica, directamente al invadir las células con el consecuente proceso inflamatorio y extensión de la lesión con el transcurso de los años comprometiendo al Sistema Nervioso Periférico.
- II. Teoría autoinmunitaria: por la generación de autoanticuerpos posterior a la exposición del parásito que reconocen proteínas del tejido conjuntivo, endocardio, laminina y del músculo estriado, entre otras.
- III. Teoría neurógena: por la producción de una estimulación excesiva que conlleva a lesiones irreversibles principalmente en las células del Sistema Parasimpático del órgano afectado.

3. Características del insecto vector

En nuestro país, el vector es conocido como vinchuca o chinches y dependiendo de las regiones el nombre variará. Este insecto, en términos técnicos, pertenece al Orden de los Hemípteros: familia Reduviidae, subfamilia Triatominae, de donde proviene su denominación triatominos. Existe una gran diversidad, de los cuales no todos cumplen con las condiciones necesarias como la adaptación a la vida en las viviendas o la defecación próxima a la herida para pasar de ser un vector potencial a uno real y epidemiológicamente importante. Es así que el de mayor importancia sanitaria es el *Triatoma infestans* ya que es posible hallarlo en el 70% del territorio nacional sobre todo en climas cálidos y secos. De forma característica, posee en los bordes externos al abdomen, un conexivo con bandas negras y amarillas alternadas, la parte anatómica que le permite el crecimiento en volumen al llenarse de sangre para soportar ayunos prolongados.

Su ciclo biológico es a partir de huevos que dependiendo de las condiciones ambientales pueden eclosionar entre los quince y cincuenta días. A partir del nacimiento hasta su forma adulta son considerados ninfas de aspecto similar a la vinchuca adulta, aunque sin alas. (Ver imagen 5) Es importante conocer que, para poder pasar a los siguientes estadios,

la ninfa desprende un exoesqueleto, característica que permite el reconocimiento de una infestación actual o pasada. En la última muda aparecen las alas y la maduración sexual. En total, el ciclo puede variar de ocho meses a un año y desde su adultez puede vivir entre uno a dos años logrando poner de 500 hasta 1.000 huevos.⁸



Imagen 5: Ciclo vital o biológico del *Triatoma infestans*.⁸

Como características principales, la vinchuca es de hábito nocturno, habita en zonas próximas al hombre y sus animales, debajo de colchones, grietas en paredes y techos o detrás de objetos que cubran la pared; todas las especies y estadíos de ninfas son hematófagas, aunque no todas se encuentran infectadas, además no es transmisible a su descendencia, pero en caso de adquirir el parásito lo transferirán durante toda su vida.

Es importante, por otro lado, reconocer la importancia de atención epidemiológica no solo a las principales especies sino también a las secundarias que podrían ser potencialmente vectores. Así como también, que el uso de insecticidas produjo un aumento de los insectos resistentes y que a pesar de asociarse la enfermedad con una problemática de la “pobreza”, la vinchuca no discriminará el material de las paredes y techos y si la vivienda y/o peridomicilio reúnen otras condiciones ambientales la colonización será inevitable.

En términos generales, no puede considerarse la enfermedad de Chagas como una afección rural o de problemática solamente de zonas donde habiten las vinchucas ya que gracias a la creciente urbanización y movimientos migratorios generaron que las demás formas de transmisión del parásito cobren la importancia que le faltaba asimilar a la población, principalmente la vía congénita. Es así que en 2012 en la Resolución 867 del Ministerio de la Salud⁹ se advirtió que los progresos del control del insecto provocaron que ya no sean la primera causa de transmisión de la enfermedad, pasando a cobrar importancia la vía vertical que provoca 10 veces más casos de infección por lo que habría más infectados en las grandes urbes que en las áreas endémicas. (Loewy, 2019)¹⁰

Por otro lado, es importante que las personas que vivan en zonas endémicas dejen de tomar a la enfermedad con naturalidad y poca prioridad en sus vidas, para lograr un diagnóstico y tratamiento a tiempo, oportuno y disminuir las consecuencias a largo plazo de la misma.¹

4. Fases de la infección por *T. cruzi*

4.1. Fase aguda

En líneas generales, la fase aguda comienza desde la infección, pero su duración varía dependiendo la edad del paciente, su estado inmunológico, la presencia de otras enfermedades preexistentes y la vía de transmisión, considerándose por lo general un plazo de alrededor de 60 días. Esta etapa se caracteriza por la presencia de elevadas concentraciones de parásitos en sangre siendo alrededor del 95% de los pacientes asintomáticos o con manifestaciones clínicas generales y la mortalidad de los pacientes en este período se encuentre entre 1% al 5%, con mayor incidencia en niños de corta edad. Es importante destacar que frente al diagnóstico de un caso agudo de infección se establece un estado de urgencia y por lo tanto un Evento de Notificación Obligatoria (ENO) y deben recopilarse antecedentes tanto epidemiológicos y ecológicos como de infección materna, transfusiones dentro de los 90 días previos a la consulta, trasplantes en el último año, patologías o tratamientos que generen inmunosupresión del paciente y probabilidad de infección accidental.

Dependiendo de la vía de transmisión se pueden enlistar una serie de signos y síntomas:

✚ **Vía vectorial:** Si bien puede presentarse en cualquier momento de la vida, el mayor riesgo se encuentra en niños menores de 10 años. Una confirmación de esta vía significa no solo la presencia del vector sino la transmisión activa de *T. cruzi* en la región. Algunos de los signos y síntomas que pueden generarse dentro de las primeras 3 semanas correspondientes al período de incubación son:

- **Inespecíficas:** fiebre prolongada, hepatoesplenomegalia, anemia, edemas, anorexia (siendo éstas últimas cuatro mencionadas más frecuentes en lactantes y niños menores a 4 años), adenomegalia, irritabilidad o somnolencia y convulsiones. Las manifestaciones clínicas más graves corresponden a la meningoencefalitis y la miocarditis como arritmias e insuficiencia cardíaca ya que pueden provocar la muerte del afectado.

- **Específicas:** Solo se presentan en el 5% de los casos y son los chagomas de inoculación. Estos se producen en el sitio de inoculación debido a una reacción inflamatoria que, si se encuentra en la periferia del ojo genera el llamado complejo oftalmoganglionar o signo de Romaña, pero pueden localizarse en cualquier parte del cuerpo siendo más frecuente la cara, brazos y piernas y, dependiendo de sus características pueden denominarse de forma particular (como el chagoma hematógeno en la dermis y tejido células subcutáneo o el lipochagoma geniano cuando alcanza la bola adiposa de Bichat).
- ✚ **Vía congénita:** Es la vía que genera el mayor número de casos en nuestro país a pesar de la existencia de la Ley 26.281 y el 90% son asintomáticos, aunque pueden presentarse hepatomegalia, esplenomegalia, ictericia, prematuridad y bajo peso, menos frecuentemente hepatitis neonatal, sepsis, miocarditis, meningoencefalitis y fiebre y aún de menor frecuencia megaesófago pudiendo aparecer tanto de forma precoz como tardía luego de los 30 días de vida.
- ✚ **Vía postransfusional:** el período de incubación varía entre 1 y 3 meses y los síntomas son los ya mencionados como fiebre y hepatomegalia, sumado a que en el 80% de los pacientes se presentan linfadenopatías y esplenomegalia.

En el caso de pacientes inmunocomprometidos que reagudicen la enfermedad o que por cualquiera de las vías de transmisión adquieran la forma aguda, las manifestaciones más frecuentes son el síndrome febril prolongado y las neurológicas como la meningoencefalitis siendo de menor frecuencia las cardiológicas como la miocarditis.

Aquellos pacientes que además posean VIH se considera riesgo de reactivación cuando poseen recuentos de CD4 inferiores a 200 cel./mm³ siendo frecuente la miocarditis, pericarditis, meningoencefalitis y síndrome febril prolongado con un riesgo a la mortalidad muy elevado a menos que se instale el tratamiento rápidamente.

Por otro lado, si los pacientes fueron trasplantados y sufren reactivación es habitual que sufran signos dermatológicos focales o multifocales como también neurológicos (meningitis, ACV, entre otros) y cardíacos (miocarditis, insuficiencia cardíaca o arritmias). Es importante destacar que todo paciente trasplantado que pueda sufrir una reactivación o una infección aguda por recibir un órgano chagásico debe ser controlado semanalmente durante los primeros 3 meses, mensualmente hasta el año y bianual posteriormente ya que la presencia de infección con *T. cruzi* no excluye el trasplante. (Secretaría de Gobierno de Salud, 2018)¹¹

4.2. Fase crónica

Es el período que continúa a la fase aguda. Dependiendo del recurso bibliográfico, se puede subdividir en una fase indeterminada o crónica sin sintomatología y la fase crónica propiamente dicha.

✚ **Fase indeterminada:** Puede durar toda la vida y se caracteriza por la ausencia de síntomas por lo que solamente puede ser detectada con la medición de anticuerpos por medio de un análisis serológico. Generalmente, luego de 15 a 20 años de padecer la infección, alrededor del 30% de los pacientes evolucionan a la fase crónica fehaciente.⁸

✚ **Fase crónica:** Corresponde a la Enfermedad de Chagas propiamente dicha caracterizada por la aparición de lesiones cardíacas y del sistema nervioso central y periférico, que conlleva a la afectación del aparato digestivo. (Instituto Nacional de Parasitología (INP) “Dr. Mario Fatala Chaben”)¹²

Por lo tanto, estos pacientes no solo poseen una serología reactiva sino también una lesión demostrada, algunas de las cuales son:

- Cardíacas: Trastornos de conducción a nivel del Haz de Hiss, arritmias supraventriculares, bloqueos auriculoventriculares, arritmias ventriculares, entre otros. Entre los 30 y 50 años de edad, un 10% de los pacientes en período crónico desarrollan miocardiopatía dilatada hallada por medio de una insuficiencia cardíaca conjuntamente con arritmias graves que pueden llegar a desencadenar una muerte súbita.¹¹
- Digestivas: Son las denominadas megavisceras como megaesófago y megacolon. Los pacientes presentarán trastornos de estreñimiento crónico, cólicos, dificultad en la evacuación, dolor de abdomen, dificultad para tragar, regurgitación, ardor en la zona del pecho, constipación persistente y prolongada, y, además pueden generar cardiopatía por compresión debido al megaesófago.
- Neuronales: Son más frecuentes en pacientes inmunocomprometidos y de forma general, se presenta un deterioro sensorial caracterizado por parestesias, hipoestesis táctiles y nociceptivas, sensibilidad vibratoria y de posición, así como también, disminución de los reflejos tendinosos. Si el *T. cruzi* logra alcanzar el SNC puede generar cuadros de meningitis.

(Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), 2020)¹³

En la siguiente imagen (*Imagen 6*) se pueden observar datos como la duración, frecuencia, parasitemia y presencia de anticuerpos de las fases de la enfermedad de Chagas:

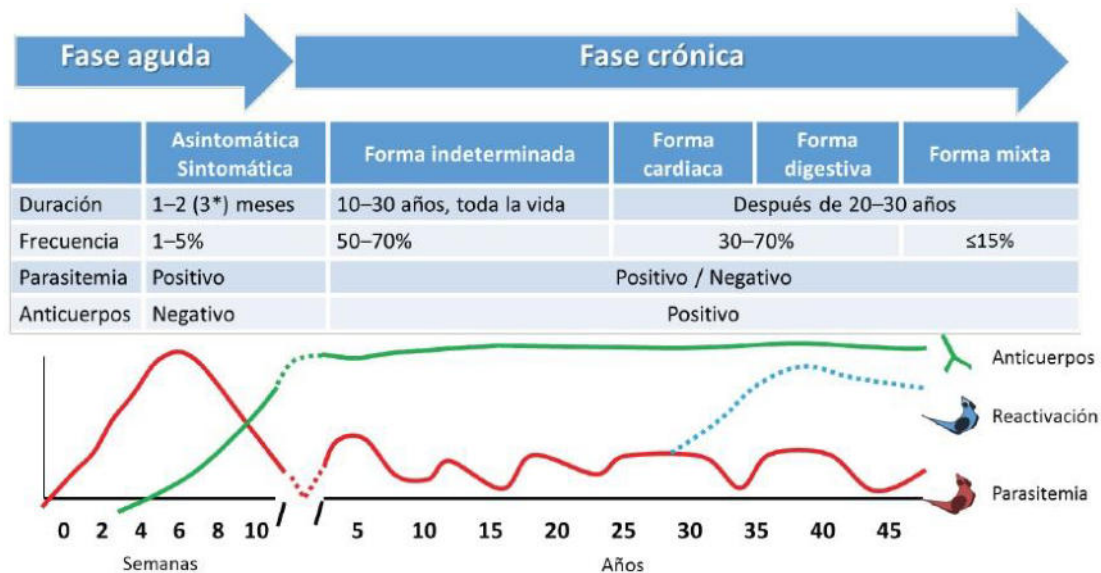


Imagen 6: Características principales del progreso de la Enfermedad de Chagas según datos del SEIMC.¹³

5. Métodos Diagnósticos

Como se puede observar en la *Imagen 6*, en aspectos generales, la gran diferencia entre la fase aguda y la crónica se determina por la presencia en concentraciones elevadas o concentraciones indetectables de parasitemia por medio de pruebas parasitológicas. Además, “Debido a la complejidad del propio parásito y de su interacción con la respuesta inmune del individuo infectado durante la evolución de la infección, ninguna prueba parasitológica ni serológica por si sola se considera gold standart”.¹³ De esta forma, las técnicas se pueden dividir en *parasitológicas directas*, donde se busca evidenciar la parasitemia y las *serológicas* para detectar los anticuerpos circulantes demostrando la respuesta inmune del huésped.

Es por esto que, las metodologías empleadas dependerán del estadio en el que se sospeche que se encuentra el paciente y debido a que la fase aguda se presenta en su gran mayoría de forma asintomática, existe una mayor proporción de individuos diagnosticados de forma tardía, en la fase crónica.

5.1. Determinaciones en Fase Aguda

La detección habitual es por medio de métodos parasitológicos directos que se basan en la visualización de tripomastigotes en sangre, lo cual, es una señal inequívoca de infección con *T. cruzi*. (Ministerio de la Salud y acción Social, 1999)¹⁴ La ventaja de dichas metodologías radica en la simplicidad del procedimiento, lo cual favorece su realización en laboratorios de baja complejidad.

Estas técnicas se realizan por medio de la utilización de microscopía, ya sea en un examen fresco o por extendidos de sangre para su posterior tinción con, por ejemplo, May-Grünwald – Giemsa (*Ver Imagen 7*) o por métodos de concentración previa de la muestra, los cuales son los más indicados debido a su sensibilidad. En éstos últimos, los más utilizados son:

- ✚ La **Prueba de Strout** que se realiza a partir de una muestra sin anticoagulante con una incubación a 37°C y ciclos de centrifugaciones para la observación del parásito en movimiento. (*Ver Imagen 7*)
- ✚ En caso de pacientes pediátricos, se utiliza la técnica **Buffy coat** (en suplantación del microhematocrito por bioseguridad), que se realiza a partir de un tubo EDTA 3K pediátrico que se lo deja reposar durante 15 minutos y se observa la interfase entre el plasma y el paquete globular.

Otras técnicas que se pueden mencionar son el hemocultivo y xenodiagnóstico.¹⁴ Por otro lado, en algunos casos es posible la realización de biopsias de tejido que tras un procesamiento histológico y tinción pueden identificarse los nidos de amastigotes.¹³

Es importante aclarar que, frente a las determinaciones serológicas, estas metodologías pueden estar asociadas a falsos negativos (paciente enfermo, diagnosticado como sano) con una tasa de entre 8 y 34 pacientes de cada mil, con la prueba de microhematocrito, 9 de cada mil con la observación directa y 21 de cada mil con los hemocultivos, por lo que se recomienda realizar un seguimiento serológico posterior (en el caso de recién nacidos, luego de los 8 meses de edad). Además, es recomendable realizarle métodos parasitológicos directos a los neonatos entre los 20 y 30 días del nacimiento, ya que es cuando se genera el pico de parasitemia.³

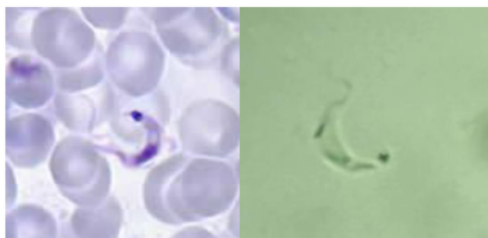


Imagen 7: Tripomastigotes. Izq.: En frotis delgado de sangre.⁵ Der.: Posterior a la realización del Strout.

5.2. Determinaciones en Fase Crónica

Como se mencionó con anterioridad, las técnicas utilizadas son aquellas que permiten la corroboración de la respuesta inmunológica frente al *T. cruzi* por medio de métodos serológicos, que se basan en la unión del antígeno con el anticuerpo, principalmente IgG (Ya que la IgM se mantiene a lo largo de la fase aguda y esporádicamente en la crónica, pero su utilización diagnóstica se encuentra discutida para ambos estadios). Estos anticuerpos se producen a partir de la segunda semana de la infección y al cabo de dos semanas posteriores alcanzan los niveles máximos que se mantendrán si el paciente no recibe tratamiento, por este motivo, la parasitemia se vuelve indetectable.¹³

Debido a la falta de un *gold standart*, ya que ninguna prueba alcanza el 100% de sensibilidad y especificidad, se establece por medio de la Resolución Ministerial N°523/97 que para el inmunodiagnóstico deberá utilizarse “...*Un mínimo de dos métodos de los citados a continuación: a) IFI, b) HAI, c) ELISA, d) Aglutinación Directa con 2-Mercaptoetanol (AD-2ME), e) Aglutinación de Partículas (látex o gelatina u otras), siempre que hayan sido debidamente estandarizadas y validados por el Centro de Referencia Nacional.*”¹⁴ Esta medida reconoce la incertidumbre que presentan las pruebas en casos tales como pacientes inmunosuprimidos o postratamiento y la utilización de reactivos de variable composición y, de esta manera, con las duplas HAI-IFI, HAI-ELISA o ELISA-IFI se puede lograr una sensibilidad entre el 98% y 99.5%. En caso de discordancia entre las dos pruebas realizadas se recomienda en primer lugar, repetir ambos ensayos de forma de descartar errores operativos y, en segundo lugar, realizar una tercera reacción serológica si se posee o remitir la muestra a un laboratorio de mayor complejidad. En caso de que la “no concordancia” persista se debe analizar una nueva muestra en un plazo de 20 a 30 días.

Ahora bien, con los avances tecnológicos, se han desarrollado técnicas basadas esencialmente en el mismo fundamento: la detección de anticuerpos específicos para antígenos de las diferentes formas de desarrollo del *T. Cruzi*, para un diagnóstico rápido y simple. Esto permitió ampliar el abanico de posibilidades metodológicas, sensibilidades y especificidades con lo que se subdividieron a las pruebas serológicas en dos tipos: las **convencionales**, donde se emplea una mezcla de antígenos crudos, purificados o totales en el formato de IFI, HAI y ELISA; y las **no convencionales**, en

las cuales los antígenos utilizados son recombinantes o péptidos combinados donde se destacan los tests inmunocromatográficos y los sistemas automatizados basados en, por ejemplo, quimioluminiscencia como el Inmunoanálisis Quimioluminiscente de Micropartículas (CMIA).¹³ A continuación se describen las técnicas mencionadas:

✚ **IFI:** Se basa en la utilización de epimastigotes de cultivo en fase estacionaria, fijados y conservados a -20°C . Luego de la incubación con la muestra, los Ac. Anti-*T. cruzi* que la misma posea se conjugarán con el parásito y la reacción será evidenciada por medio del empleo de un Ac. secundario o conjugado de anti-Igs humanas marcados con fluorocromos que deben cumplir ciertos requisitos:

- a) La molécula debe ser capaz de generar uniones estables con la proteína.
- b) El rendimiento cuántico no debe verse afectado luego de la conjugación.
- c) El color de la fluorescencia posterior a la conjugación debe ser diferente a la emitida de forma primaria.
- d) No debe interferir con las propiedades inmunológicas del anticuerpo.
- e) El conjugado debe ser estable para su almacenamiento.
- f) El conjugado no debe ser tóxico.

Actualmente, el único compuesto que cumple con los seis ítems mencionados es el isotiocianato de fluoresceína (FITC) con un máximo de absorción significativo en el azul visible entre los 470 y 490nm y un máximo de fluorescencia a pH 8. (Ver imagen 8)

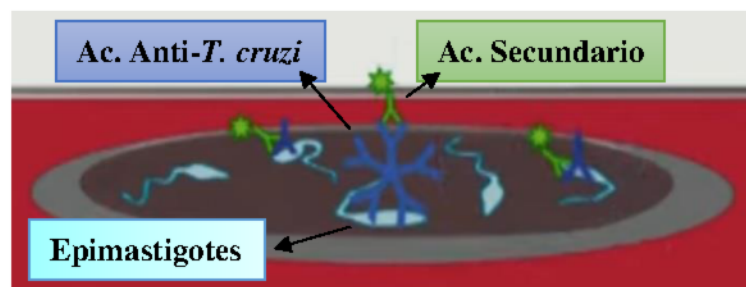


Imagen 8: Esquemización de la reacción en la IFI.

Fuente: <https://www.youtube.com/watch?v=xqvHsIWETjs>

Para la determinación de positividad es necesario un microscopio de fluorescencia y se puede determinar el título, dando un Rdo. Semicuantitativo o un Rdo. Cualitativo (Positivo/Negativo). Como ventajas de la técnica en comparación con la IF directa, cabe mencionar que no requiere de un Ac. específico y la fluorescencia es más intensa; y como desventaja los costos del material requerido. (INP, *Fatalakit IFI*)¹⁵

- ✚ **HAI:** Consiste en la detección de Ac. Anti-*T. cruzi* a través de hematíes sensibilizados con Ag. obtenidos a partir de un cultivo de parásitos, que presentará aglutinación en caso de ser positiva la muestra. Dependiendo el fabricante, serán los antígenos utilizados y, por lo tanto, la sensibilidad y especificidad de la metodología.
- ✚ **ELISA:** De forma general, se trata de un método inmunoquímico de interacción primaria que se basa en la capacidad específica del reconocimiento y unión Ag-Ac. Se utilizan pocillos sensibilizados con Ag. de *T. cruzi* a los cuales, luego de etapas de lavados y bloqueo, se incuban con la muestra del paciente que, si contiene Ac. específicos, se formarán complejos Ag-Ac. Por medio de la utilización de un Ac. secundario conjugado con una enzima (generalmente peroxidasa), la cual catalizará una reacción química, se obtendrá un producto coloreado luego de un paso de revelado y detención, para su posterior medición de absorbancia.
- ✚ **Test inmunocromatográfico:** Se componen de dispositivos con una membrana con Ag. recombinantes de *T. cruzi*, por lo que, al colocar una determinada cantidad de muestra del paciente, si éste posee los anticuerpos se formará un complejo Ag-Ac con conjugación del oro coloidal, siendo evidente por la formación de una “línea de prueba” en conjunto con la línea control, luego de un lapso corto de tiempo. El resultado por lo tanto es cualitativo. (SD Bioline Chagas Ab Rapid, 2016)¹⁶
- ✚ **CMIA:** Se trata de un inmunoanálisis para la detección cualitativa de IgG frente a *T. cruzi* por medio de la combinación de la muestra con un diluyente y micropartículas paramagnéticas recubiertas con el Ag del parásito. Si existen Ac., estos se unen a las partículas que luego de un ciclo de lavado se incuban con un conjugado marcado que posteriormente generará quimioluminiscencia medida en Unidades Relativas de Luz (URL). A partir de un punto de corte se establece la positividad o negatividad de la muestra o presencia en la “zona gris” caso en el que se debe analizar la muestra por duplicado y/o tomar una segunda muestra con un período razonable de tiempo o realizar un ensayo adicional. (Alinity Chagas Reagent Kit, 2020)¹⁷

En comparación con las técnicas convencionales, las no convencionales se encuentran asociadas con falsos negativos con una prevalencia del 26,3% que se traduce como 17 de cada mil pacientes con la inmunocromatografía (ICT) y 2 de cada mil con el

CMIA afectando la especificidad de las metodologías. En cambio, no se consideran sustanciales las diferencias en lo que respecta la sensibilidad. Es por esto que, se recomienda utilizar la prueba de ELISA o la ICT en los estudios poblacionales.³

6. Embarazo

Las pruebas de tamizaje durante el embarazo son de suma importancia debido a que la vía congénita se ha vuelto la principal causa de transmisión, viéndose favorecida por los movimientos migratorios y el control de la vía vectorial. Además, si el tratamiento se instaure durante el primer año de vida, existe una demostrable negativización de la parasitemia y/o serología en más del 90% de los casos, enunciada en 2012 por medio de la Resolución 867⁹, manifestándose que 9 de cada 10 niños tratados en la fase aguda y 7 de cada 10 en la fase crónica, se curan. Por ese motivo, se hace hincapié en la optimización del diagnóstico precoz y tratamiento oportuno, aumentando la buena respuesta al último mencionado, cuanto menor es la edad del paciente.

Por otro lado, en niños y adolescentes con infección crónica y tratamiento tripanocida, se evidencia una importante reducción de los títulos serológicos e incluso una seroconversión negativa y en mujeres de edad fértil, no embarazadas, el tratamiento es recomendado, ya que actúa como factor preventivo disminuyendo unas 20 veces la probabilidad de transmisión congénita.¹¹

Es tal la trascendencia, que por medio de la Ley 26.281⁴ en el artículo 4° se expresa la obligatoriedad de la realización y notificación de pruebas diagnósticas en toda mujer embarazada, en los recién nacidos, en hijos de madres infectadas, hasta el primer año de vida y todos aquellos hijos/as menores de 14 años. Es por esto que, el seguimiento del hijo al nacer, conociendo que el diagnóstico de la madre es positivo, se realiza con una técnica parasitológica directa posterior al nacimiento y por lo menos dos pruebas confirmatorias serológicas posteriores a los 9 meses de edad, a pesar de que la primera sea negativa, y se deberá seguir la evolución el título serológico durante el primer año de vida. Este plazo se debe a que durante la gestación el niño puede haber recibido de su madre, anticuerpos que se mantendrán en circulación hasta aproximadamente los 8 meses de vida.

A su vez, debido a que el tratamiento no se encuentra recomendado en pacientes embarazadas por complicaciones que pueda producir tanto a la gestante como a la evolución del embarazo, se remarca la importancia del diagnóstico en el neonato y en caso de mujeres en edad reproductiva (según la OMS de 15 a 44 años) de ser posible con

chagas confirmado antes del embarazo, se recomienda además del tratamiento tripanocida un método anticonceptivo de barrera.¹¹

Objetivos

La tripanosomiasis americana es una enfermedad desatendida, una patología que, a pesar de los avances en la investigación y el control, sigue siendo la principal afección parasitaria de América Latina habiendo dejado de lado los contextos rurales, pasando a ser una problemática de importancia urbana y global. Su máxima expresión reside en los conflictos para su diagnóstico y tratamiento debido a que, en su gran mayoría, los pacientes son asintomáticos y se detectan de forma tardía.

La tardanza no solo se debe a las cuestiones inherentes a la enfermedad, sino también, a la falta de integración de todas las áreas involucradas en la patología, hecho que se viene acarreado desde hace tiempo denotado por las palabras de Carlos Chagas y Emmanuel Dias en 1997 (como se citó en *Hablamos de Chagas*)¹ donde afirmaron que “*más que las innovaciones técnicas, la superación definitiva de la enfermedad de Chagas humana implica, sobre todo, voluntad política y responsabilidad social*”, ya que es fundamental abordar el tema en todos los niveles educativos para que sea conocido desde la escuela primaria básica hasta los médicos y el personal de salud.

Hoy en día, las guías informadas por la evidencia constituyen una herramienta muy útil en la salud pública y práctica clínica ya que, busca garantizar una atención de calidad y fidedignidad en los resultados, por medio de análisis de calidad y efectividad, entre otras prácticas.^{1,3} Por lo expuesto, es necesario que el laboratorio utilice técnicas que con el avance del tiempo sean más específicas y sensibles y, por lo tanto, verificar dichos parámetros en la población de estudio.

En consecuencia, este trabajo final se centró en el análisis de las muestras derivadas al HEC, tanto de los CAPS de Berazategui, Florencio Varela y Quilmes, como de las muestras del HEC, propiamente dichas, para la determinación del diagnóstico de Chagas y evaluación de las técnicas utilizadas, asegurando la veracidad de los resultados.

Objetivo General

Verificar la sensibilidad y especificidad de las metodologías diagnósticas utilizadas en el HEC para el diagnóstico de pacientes chagásicos a partir de todas las muestras remitidas al mismo con dicha solicitud.

Objetivos Específicos

- ✚ Describir la distribución, frecuencia y factores de la población de trabajo correspondiente a la edad, sexo y localización geográfica.
- ✚ Conocer la frecuencia de pacientes reactivos y no reactivos según grupos etarios y sexo.
- ✚ Evaluar si las metodologías cumplen con las especificaciones del fabricante.
- ✚ Evaluar si las metodologías son comparables entre sí.

Materiales y Métodos

El trabajo final se realizó en el laboratorio del Hospital de Alta Complejidad El Cruce – Néstor Kirchner. Las muestras biológicas se obtuvieron a partir de dos fuentes principales, las derivaciones y las muestras del HEC, las cuales pueden subclasificarse según localidad y servicio respectivamente.

Las muestras con solicitud del análisis de Chagas provenientes de derivaciones fueron remitidas por los CAPS de Berazategui, Florencio Varela y Quilmes; por otro lado, las muestras provenientes del hospital pertenecían a pacientes internados, ambulatorios o provenientes del Programa de Evaluación Externa de la Calidad (PEEC) de la FBA o del Control de Calidad Externo del INP “Dr. Mario Fatała Chaben”.

Para el diseño de este trabajo, fueron aceptadas todas las muestras procesadas en el hospital ya fueran de pacientes adultos y pediátricos de forma indistinta de procedencia y fueron rechazadas aquellas muestras que resultaron insuficientes para la realización de los métodos o su matriz no fue la correcta para la determinación en todas las técnicas.

1. Procesamiento de muestras

En esta etapa se procesaron todas las muestras por medio de tres técnicas serológicas:

1.1. Test inmunocromatográfico

Fueron utilizadas las pruebas diseñadas para la detección rápida, cualitativa y diferencial de un paso de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* de la compañía Abbott línea SD Bioline en suero, plasma o sangre entera.

El cassette se compone de una membrana que incluye:

- ✚ Conjugados de oro: Antígeno recombinante de *T. cruzi* – oro coloidal.
- ✚ Línea de prueba: Antígeno recombinante de *T. cruzi*.
- ✚ Línea de control: IgG de cabra antirratón.

Para el procedimiento es importante cumplir con las especificaciones del fabricante, que constan en que los dispositivos y las muestras se encuentren a temperatura ambiente antes de la prueba y deben ser utilizados sobre una superficie plana y seca. Para el análisis (*Ver imagen 9*) se colocaron 100µl de suero en el pozo de muestras, donde si la misma posee anticuerpos de *T. Cruzi* reaccionan con el antígeno recombinante y el oro coloidal se conjuga formando un complejo Ag-Ac. El mismo migrará a lo largo de la membrana por capilaridad y será capturado en la línea de prueba (T) generando una línea rosada, realizando la interpretación de los resultados a los 15 minutos, ya que lecturas tardías provocarían resultados falsos.

Es importante aclarar que la prueba consta de la línea de control (C), que es como su nombre lo indica, el control del procedimiento y siempre debe aparecer para validar el resultado.

Es entonces que, los resultados pueden ser (*Ver imagen 9*): **Negativos**, en caso de observarse solo la presencia de la línea “C”; **Positivos**, en caso de observarse una línea en “C” y “T” a pesar de que esta última se observe débil; e **Inválido** si no se observa la línea “C”.

La sensibilidad declarada por el fabricante es de 99,3% y la especificidad del 100%.¹⁶

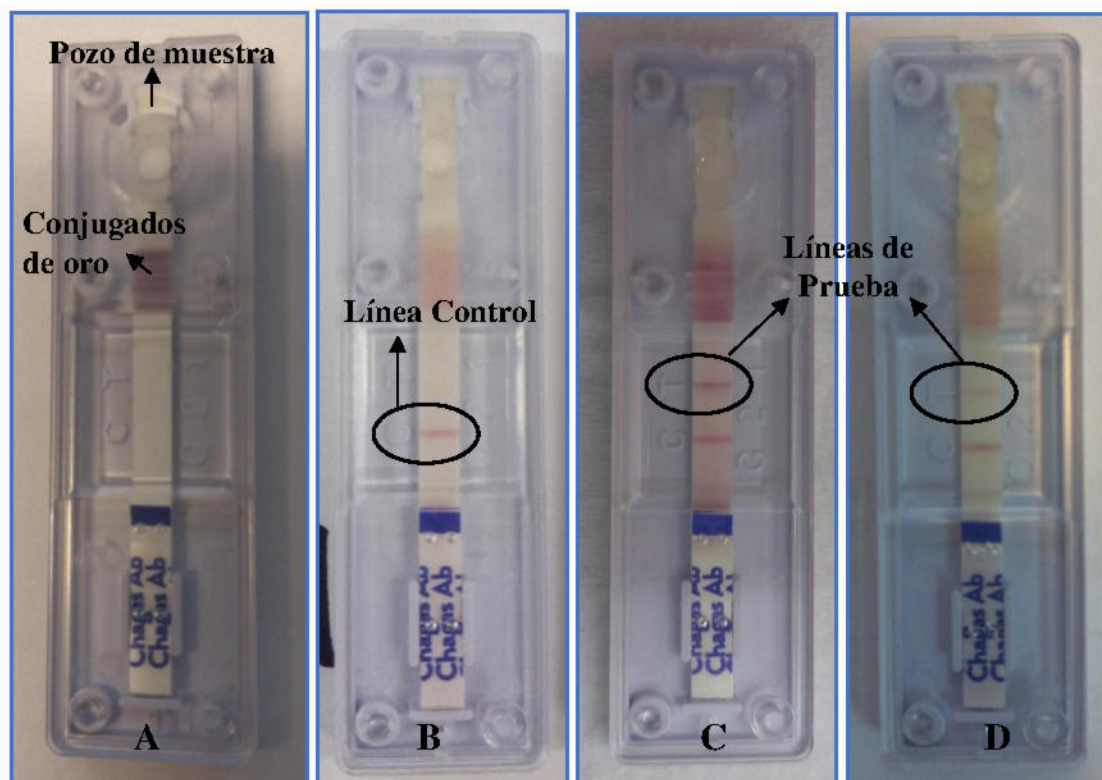


Imagen 9: A. Cassette sin inocular. B. Chagas Negativo. C. Chagas Positivo. D. Chagas Positivo Débil.

1.2. Inmunoanálisis



Fue utilizado el ensayo de Inmunoanálisis Quimioluminiscente de Micropartículas (CMIA) para la detección cualitativa de anticuerpos frente *T. cruzi* del equipo de la compañía de Abbott (Ver imagen 10), Alinity i – Chagas Reagent Kit en suero y plasma humanos para el diagnóstico de la infección y cribado en receptores de transfusiones o donaciones.¹⁷

Imagen 10: Equipo Alinity i de Abbott.

Este ensayo se basa en las proteínas recombinantes FP3, FP6, FP10 y TcF que incluyen 14 regiones antigénicas representativas de las tres formas morfológicas del *T. cruzi*, lo que permite la identificación de anticuerpos tanto en la fase aguda como crónica de la enfermedad.

En cuestiones metodológicas, se trata de un ensayo de dos pasos que permite el reconocimiento de IgG por medio de, en primer lugar, la combinación de la muestra con el diluyente de la prueba y, en segundo lugar, la mezcla se combina con las micropartículas paramagnéticas recubiertas de los antígenos de las proteínas ya mencionadas. Esto permite que, en caso de ser positivo, los anticuerpos se unan a las partículas y por medio de la utilización de un anticuerpo conjugado anti-IgG humana marcado con acridino genere una reacción quimioluminiscente medido en URL, generando así una relación directamente proporcional entre las URL detectadas por el sistema óptico con la concentración de anticuerpos en la muestra.

El punto de corte es establecido por la calibración del equipo que, una vez aceptada y almacenada, se puede utilizar por 14 días a menos que se cambie el lote de reactivo o el control diario de la prueba se encuentra fuera del límite.

Es entonces que se procedió al control diario del equipo con los controles suministrados por el fabricante: (Ver imagen 11)

- ✚ Un control negativo que contiene plasma humano recalcificado sin reactividad.
- ✚ Un control positivo de igual matriz que sí posee reactividad de anticuerpos frente a *T. cruzi*.



Imagen 11: De izquierda a derecha, se muestra el Control Negativo y Positivo de la metodología.

Posteriormente, se analizaron todas las muestras, teniendo en cuenta que la interpretación de los resultados es la declarada en el inserto:

- ✚ **No reactivo:** Valores por debajo de 0.80 URL.
- ✚ **Zona Gris:** Valores entre 0.80 y 1.00 URL.
- ✚ **Reactivo:** Valores superiores a 1.00 URL.

La sensibilidad declarada por el fabricante es del 100% y la especificidad de entre 99,96% y 100%, dependiendo la categoría de las muestras.

1.3. IFI

Para la realización de la Inmunofluorescencia Indirecta cualitativa fueron utilizados los siguientes reactivos y material principal¹⁵:

- ✚ Suspensión antigénica (1 ml): Constituida por epimastigotes de *T. cruzi* tratados con una solución formolada, a partir de cultivos en medios bifásicos cosechados en la fase exponencial de crecimiento favoreciendo así, la separación de los parásitos y evitar la formación de detritos. Título aproximado 1/70. Provista por el INP “Dr. Mario Fatala Chaben”. (Ver imagen 12)
- ✚ Suero testigo reactivo (0.5ml): Glicerinado diluido al medio con título para IFI de 128 y HAI 32. Provisto por el INP “Dr. Mario Fatala Chaben”. (Ver imagen 12)
- ✚ Suero testigo no reactivo (0.5ml): Glicerinado diluido al medio. Provisto por el INP “Dr. Mario Fatala Chaben”. (Ver imagen 12)
- ✚ Anti inmunoglobulina humana (G, A y M) conjugada con FITC (0.20ml): Con título sugerido 1/400. Cortesía del Hospital Británico. (Ver imagen 13)
- ✚ Solución de Azul de Evans al 1% (5ml): Listo para usar. Cortesía del HEC. (Ver imagen 14)
- ✚ Solución Salina Estabilizadora (SSE): También conocida como buffer PBS en presentación liofilizada compuesta por fosfato disódico dihidratado (Na_2HPO_4), fosfato monosódico monohidratado (NaH_2PO_4) y Cloruro de Sodio (NaCl) de pH

7.3 ± 0.10 para ser diluida en 1 litro con agua destilada. Cortesía del HEC. (Ver imagen 15)

✚ **Líquido de montaje (5ml):** Compuesto glicerinado con azida sódica al 0.1% como conservante. Cortesía del HEC. (Ver imagen 16)

✚ **Improntas:** Portaobjetos de vidrio no fluorescente marcados con doce divisiones indelebles en forma circular de 8mm de diámetro. 50 unidades (Negras) Provistas por el INP “Dr. Mario Fatala Chaben” y 10 unidades (Verdes y Rojas) cortesía del HEC. (Ver imagen 17)

✚ **Microscopio de fluorescencia** (Ver imagen 18)

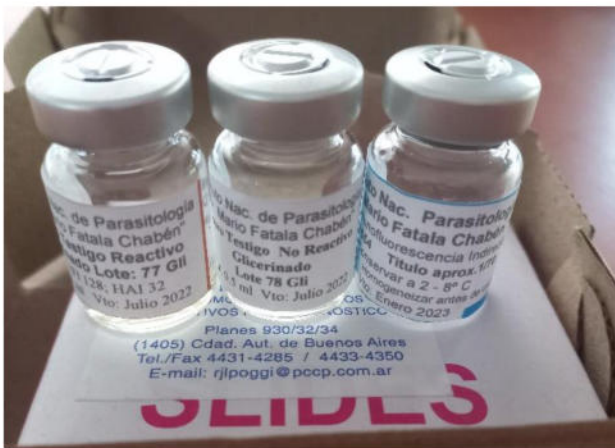


Imagen 12: De izq. a Der. Suero testigo reactivo, No reactivo y Antígeno.



Imagen 13: Anti Ig. humana (G, A y M) conjugada con FITC.



Imagen 14: Azul de Evans.



Imagen 15: Solución PBS.



Imagen 16: Medio de montaje.

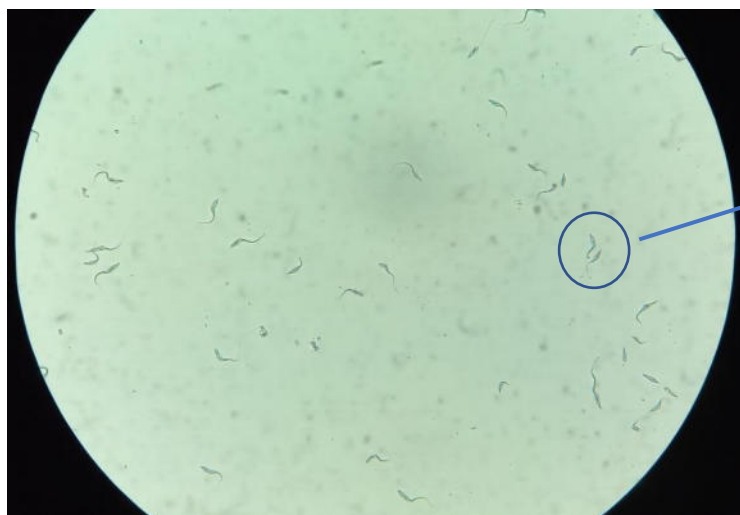


Imagen 17: Improntas



Imagen 18: Microscopio de Fluorescencia.

En primera instancia, se debió preparar las improntas. Para ello fue necesario diluir la suspensión antigénica de acuerdo al título con PBS, hasta que se pudiesen visualizar de 20 a 40 parásitos por campo microscópico con el objetivo de 40X, cuando se fijan 25µl de dicha suspensión en cada división de las improntas limpias y desengrasadas.¹⁸ La dilución correcta fue 1/75, como se puede observar en la *Imagen 19*.



Epimastigotes.

Imagen 19: Campo en el microscopio óptico con 400 aumentos. Se observan aprox. 33 epimastigotes.

Una vez conseguida la dilución correcta de la suspensión antigénica, se procedió a la preparación de todas las improntas. Para ello se calculó un total de 9.900µl necesarios y siendo la dilución 1/75, se tomaron 132µl de suspensión Ag. y se llevaron al volumen final precisado con 9.768µl de PBS.



Acto seguido, se colocaron 25µl de la dilución en cada división de la impronta y se lo dejó secar por medio de aire caliente. Cumplida la meta, se procedió a la fijación física, flameando el preparado a la llama. (*Ver imagen 20*)

Imagen 20: Flameado en mechero de bunsen.

Paso siguiente, se lavaron las improntas con agua destilada y se secaron con aire frío. Una vez finalizado el procedimiento se conservaron en el congelador a -20°C en caja de plástico, bien protegida de la humedad.

En segunda instancia, se dispuso que la dilución utilizada de la Anti Ig. Humana conjugada sería la otorgada por las especificaciones del fabricante y al necesitarse también 25µl para cada división de la impronta, se calculó un volumen final necesario de

9.900µl por lo que se tomaron 25µl de Anti Ig. Humana a los cuales se le agregaron 9.975µl de PBS dando un total de 10.000µl. Se conservó al abrigo de la luz.

A su vez, se estandarizó por recomendaciones de las profesionales de inmunofluorescencia del HEC, la utilización de 3µl de Azul de Evans para cada división a la hora de su utilización.

Finalmente, las diluciones de los sueros testigos y las muestras de los pacientes se determinaron en 1/32, ya que la IFI se realizó de forma cualitativa y es la dilución que, en primer lugar, se utiliza cuando se realizan titulaciones (1/32, 1/64, 1/128)¹⁵ y, en segundo lugar, resulta comparable con el método de Aglutinación en Partículas de Gelatina (APG) utilizado en aquellos casos donde los resultados del test rápido y el CMIA dieron discordantes.

Es así que, en el caso de los sueros testigos se calculó la necesidad de 1400µl considerando que en cada impronta se utilizarían solo 25µl de cada uno (en cada una siempre debe haber un control positivo y un control negativo de la técnica). Por lo tanto, se preparó utilizando 88µl de testigo con 1320µl de PBS dando un volumen final de 1408µl teniendo en cuenta que el mismo fue provisto con una dilución al medio. En el caso de las muestras de los pacientes, se tomaron 2µl de suero a los cuales se le adicionaron 62µl de PBS dando un volumen final de 64µl.

Para el desarrollo de la técnica propiamente dicha, se tomaron de referencia los pasos detallados por el Manual de Laboratorio del INP “Dr. Mario Fatała Chaben”¹⁸:

- 1) Sacar las improntas necesarias del congelador y secarlas a temperatura ambiente sobre papel.
- 2) Colocar 25µl de la dilución del suero problema en cada división, dejando dos libres correspondientes para 25µl de control negativo y positivo. (Ver imagen 21)

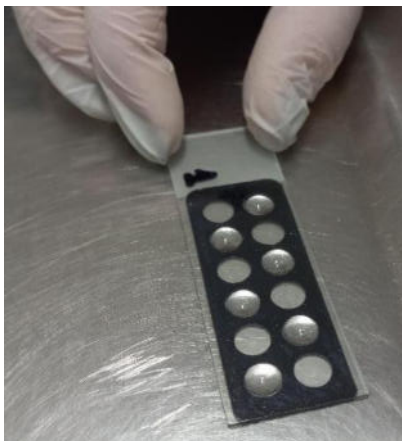


Imagen 21: Impronta previa a la primer incubación.

Se dispusieron las muestras en zigzag por recomendación de profesionales.

- 3) Incubar los portaobjetos en cámara húmeda, compuesta por un papel de filtro humedecido para evitar la evaporación de los reactivos, por 30 min. en estufa a 37°C.
- 4) Lavar los portaobjetos con cuidado con agua destilada evitando la contaminación de las divisiones adyacentes. Luego se sumergen en PBS de forma vertical en una jarra de Koplín u horizontal en otro tipo de recipiente, durante 5 minutos, dos veces consecutivas. Finalmente se debe enjuagar con agua destilada.
- 5) Dejar secar los preparados en papel de filtro con aire frío.
- 6) Cubrir cada división con 25µl de anti Ig-humana marcada a la cual se le adicionó posteriormente 3µl de Azul de Evans en cada una, procurando la correcta mezcla con la solución del anticuerpo conjugado. (Ver Imagen 22)

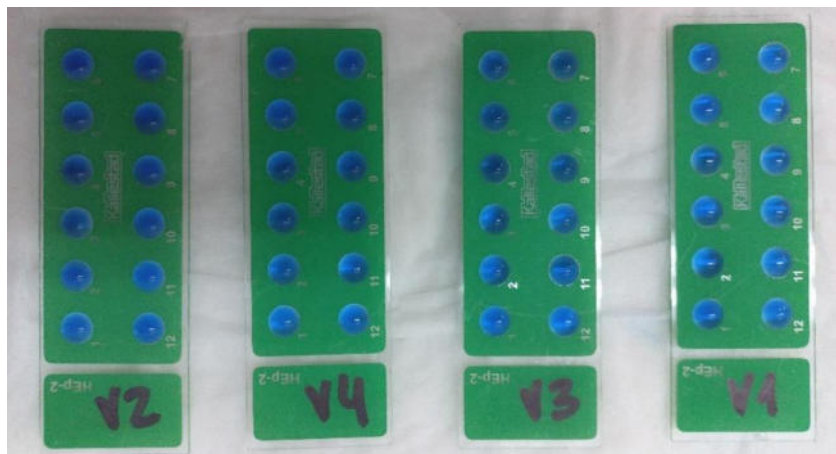


Imagen 22: Improntas con Anticuerpo marcado y Azul de Evans.

- 7) Incubar a 37°C en estufa durante 30 minutos.
- 8) Lavar las improntas de la misma forma explicada en el paso 4. Véase en la Imagen 23 como debe lavarse con agua destilada para evitar el contacto entre divisiones.



Imagen 23: Para evitar el contacto entre divisiones, se debe inclinar la impronta hacia un lado, empujar suavemente con el agua destilada cada una y viceversa.

- 9) Dejar secar los preparados en papel de filtro con aire frío.
- 10) Colocar una el líquido de montaje de forma que se distribuya por toda la impronta luego de la colocación del cubreobjetos. Para poder ser leído en el microscopio de fluorescencia. (Ver Imagen 24)



Imagen 24: A. Colocación del montaje.
B. Dispersión del mismo luego de la colocación del cubreobjetos.
C. Observación al microscopio.

*Es importante aclarar que todos los reactivos preparados fueron conservados en heladera hasta su uso.

Finalmente, se analizaron todas las muestras comparando siempre con el control positivo y negativo (los primeros que se deben observar) para poder discernir entre un resultado positivo de una negativo. El control negativo debe presentar una coloración con baja o ninguna fluorescencia; el control positivo debe presentar los parásitos teñidos de un color verde fluorescente siendo particularmente intensa en la membrana y el flagelo del parásito. (Ver Imágenes 25,26)

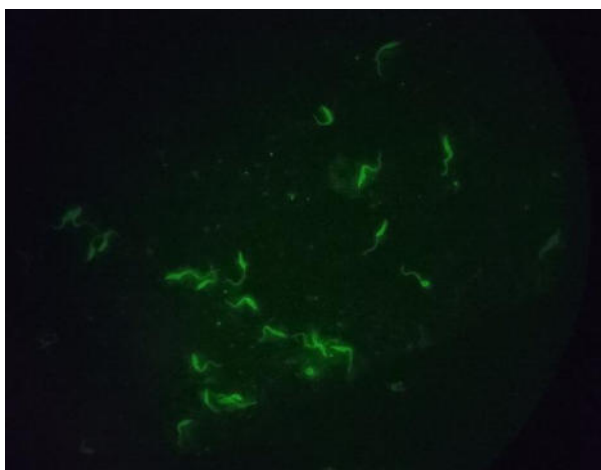


Imagen 25: Control Positivo.

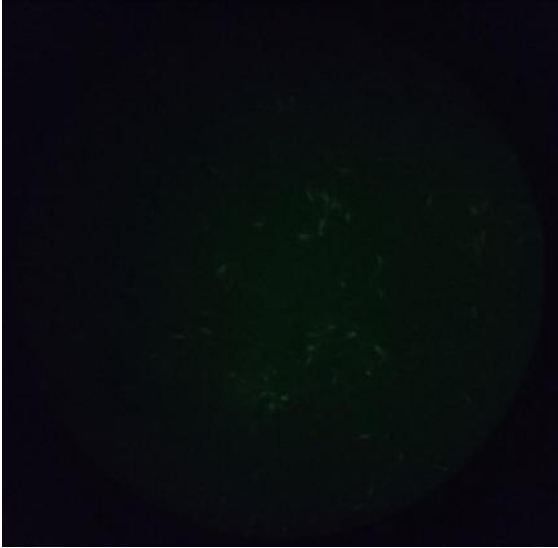


Imagen 26: Control Negativo.

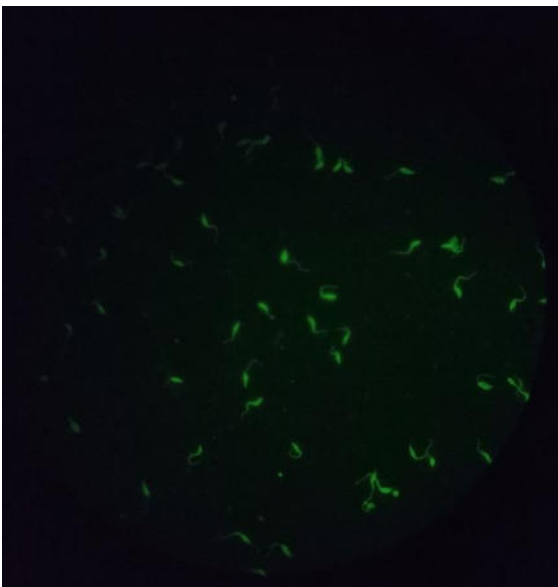


Imagen 27: Paciente Positivo.

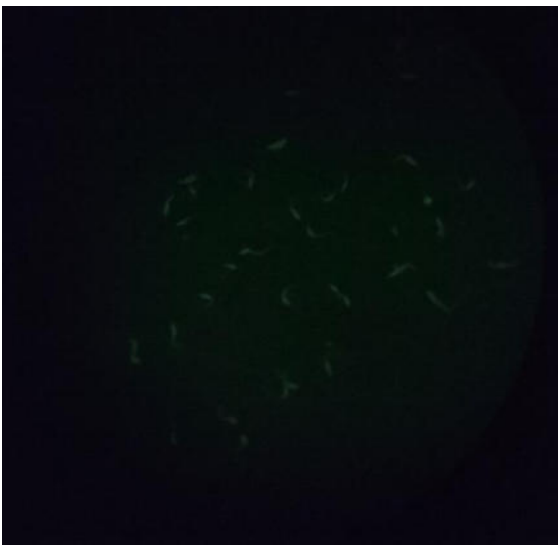


Imagen 28: Paciente Negativo.

2. Muestras discordantes: Procesamiento por un tercer método =====

En el HEC las muestras que resultan discordantes, es decir, aquellas que luego de la realización del test rápido y el CMIA se obtienen resultados diferentes en ambas pruebas (una positiva y otra negativa), se procesan por medio de un tercer método, la APG.

Para la Aglutinación en Partículas de Gelatina se utilizó una prueba de diagnóstico in vitro para la detección de anticuerpos Anti-*T. cruzi* en muestras de suero o plasma tanto cuantitativo como cualitativo, de la compañía Fujirebio INC. línea SERODIA – Chagas. Este test se basa en el principio de aglutinación de las partículas sensibilizadas ante la presencia de anticuerpos frente al parásito. En este caso, se procedió de forma cualitativa siguiendo las especificaciones del fabricante. (Ver tabla 1) (SERODIA-Chagas,2015)¹⁹

Pocillo N°	1	2	3
Diluyente de Muestra	75 µl	25 µl	25 µl
Muestra o Control +	25 µl	25 µl	25 µl
Dilución de la muestra	1/4	1/8	1/16
Partículas Control		25 µl	
Partículas Sensibilizadas			25 µl
Dilución Final		1/16	1/32

Tabla 1: Cantidades de reactivos y muestra para la prueba cualitativa.



Imagen 29: Componentes del kit.

El procedimiento se realizó en policubetas de fondo en “U” siguiendo las cantidades determinadas en la tabla 1. Con cada determinación debe realizarse el control positivo que se provee en el mismo kit. (Ver Imagen 29) Una vez finalizado, se cubrió la placa y se dejó en reposo horizontalmente a temperatura ambiente durante dos horas.

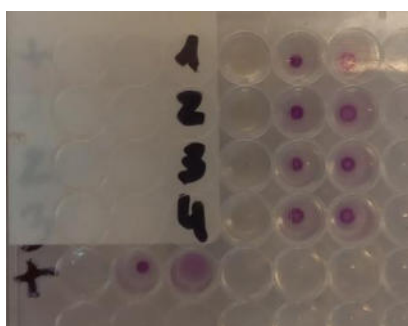


Imagen 30: Px Negativos (del 1 al 4) y Control Positivo (+)

La lectura de los resultados se realizó visualmente teniendo en cuenta que se consideran **Negativas** aquellas muestras que generen partículas concentradas en forma de botón o anillo en el centro del pocillo con borde externo suave y redondeado y **Positivas** las que presenten un anillo grande con borde multiforme o con partículas firmemente aglutinadas distribuidas cubriendo el fondo de forma uniforme. (Ver Imagen 30)

3. Sensibilidad y especificidad

Las pruebas serológicas cualitativas no tienen en la respuesta un error total permitido ya que tienen exactitud diagnóstica por medio de resultados binarios: Positivo/Negativo, Reactivo/No reactivo. (Aberer, 2019)²⁰ Es por esto, que para obtener calidad en el diagnóstico es de suma importancia evaluar y comparar lo declarado por el fabricante verificando los requisitos fundamentales:

- ✚ **Validez:** Es el grado en el que una prueba mide lo que realmente debe medir, para lo que fue diseñada la misma. La determinación de este requisito, se determina por medio de la sensibilidad y la especificidad.
- ✚ **Reproductividad:** Es la capacidad de la prueba de emitir resultados concordantes en mediciones sucesivas bajo las mismas condiciones de medición.
- ✚ **Seguridad:** Se determina mediante la utilización de los parámetros de Valor Predictivo Positivo (VPP) y Negativo (VPN), es decir, el grado de confianza de que un resultado positivo indica con determinada probabilidad, que el paciente realmente posee la enfermedad y viceversa. Se encuentra dependiente entonces, a la prevalencia de la patología y la correlación entre el resultado con la clínica del paciente, lo que conlleva a la toma de decisión clínica.

Este trabajo se centró en la determinación de la sensibilidad y especificidad, parámetros que deben ser definidos para su comprensión:

- ✚ **Sensibilidad:** Es la probabilidad de que un individuo enfermo de un resultado positivo y así diagnosticar correctamente al paciente. Idealmente las pruebas deben ser 100% sensibles, es decir, no poseer elevado porcentaje de falsos positivos (Paciente sano, diagnosticado con la patología). La ecuación por la cual se define la sensibilidad es la siguiente:

Donde: ➤ **VP:** Verdaderos Positivos.
 ➤ **FN:** Falsos Negativos.

$$\frac{VP}{VP + FN} \times 100$$

- ✚ **Especificidad:** Es la probabilidad de que un individuo sano de un resultado negativo y así aquellos pacientes que no tienen un trastorno clínico son designados como tal. Idealmente las pruebas se quieren 100% específicas, evitando así resultados falsos negativos (Paciente con la patología que es diagnosticado erróneamente como sano). La ecuación por la cual se define la especificidad es la siguiente:

- Donde:
- **VN:** Verdaderos Negativos.
 - **FP:** Falsos Positivos.

$$\frac{VN}{VN + FP} \times 100$$

Los parámetros de seguridad también pueden ser determinados por medio de ecuaciones:

$$\frac{VN}{VN + FN} \times 100 = VPN$$

$$\frac{VP}{VP + FP} \times 100 = VPP$$

Estas determinaciones de parámetros analíticos constituyen al grado de fidedignidad de los resultados, muy importante debido a que las pruebas de laboratorio tienen un impacto directo no solo con las decisiones médicas, sino también en la sociedad. Se dice que Salvador Mazza insistía con que a pesar de estar mirando al microscopio con el mayor de los aumentos no debía dejarse de ver a las personas en su totalidad¹, por lo que implementar controles de calidad externos y definir los requisitos disminuye el riesgo clínico y aumenta la validez diagnóstica.

4. Análisis de Datos

Para todo el análisis de datos, fue necesario el armado de una planilla de Excel donde se volcaron todos los valores obtenidos y datos conocidos de los pacientes. Fueron evaluados todos los resultados en conjunto, sin discernir en su procedencia, pero con el fin de definir las características poblacionales, se utilizaron los datos obtenidos a partir del Sistema Informático del Laboratorio (SIL) para el análisis de distribución y factores como la edad y el sexo.

En caso de todas las muestras provenientes de pacientes femeninas en edad fértil, se obtuvo mediante la utilización de Intranet – CIPRES, la información respecto a si las pacientes se encontraban embarazadas, lo que permitió determinar la frecuencia de atención a gestantes y su porcentaje de positividad. El único inconveniente con este paso, fue que si el DNI de la paciente cargado en el sistema era incorrecto, no se podía obtener dicho dato. Además, por medio de la misma página, se pudo verificar y corregir la edad y sexo de los pacientes.

Por otro lado, de las muestras provenientes de pacientes del HEC, también se pudo definir el servicio que solicitó la prueba. Finalmente, se evaluó la sensibilidad, especificidad y seguridad de las metodologías para su comparación con las especificaciones del fabricante y entre sí.

Resultados

Se evaluaron un total de 184 muestras remitidas al laboratorio del HEC durante el mes de febrero de 2022. De las mismas, 177 (96,20%) tenían la solicitud de realización de los estudios para el diagnóstico de Chagas y provinieron de pacientes que fueron atendidos en los diferentes CAPS de los partidos de Florencio Varela, Quilmes y Berazategui o del mismo hospital de diferentes servicios. El valor restante, correspondientes a 7 muestras (3,80%) fueron proporcionadas, 1 (14,29%) por el Programa de Evaluación Externa de la Calidad (PEEC) de la FBA y 6 (85,71%) por el Control de Calidad Externo del INP “Dr. Mario Fatała Chaben”, siendo las últimas rechazadas para el análisis de este trabajo ya que no pudieron ser procesadas por dos de las tres metodologías principales de diagnóstico en evaluación (ICT, CMIA e IFI).

Es así que de las 178 muestras procesadas la distribución fue: 95 muestras (53,37%) procedentes de los CAPS de Florencio Varela, 51 muestras (28,65%) procedentes de los CAPS de Quilmes, 29 muestras (12,92%) procedentes del Hospital “El Cruce” y 9 muestras (5,06%) procedentes de los CAPS de Berazategui. La descripción de la población con la cual se trabajó se detalla a continuación: *Ver gráficos 1,2,3,4 y Tabla 2.*

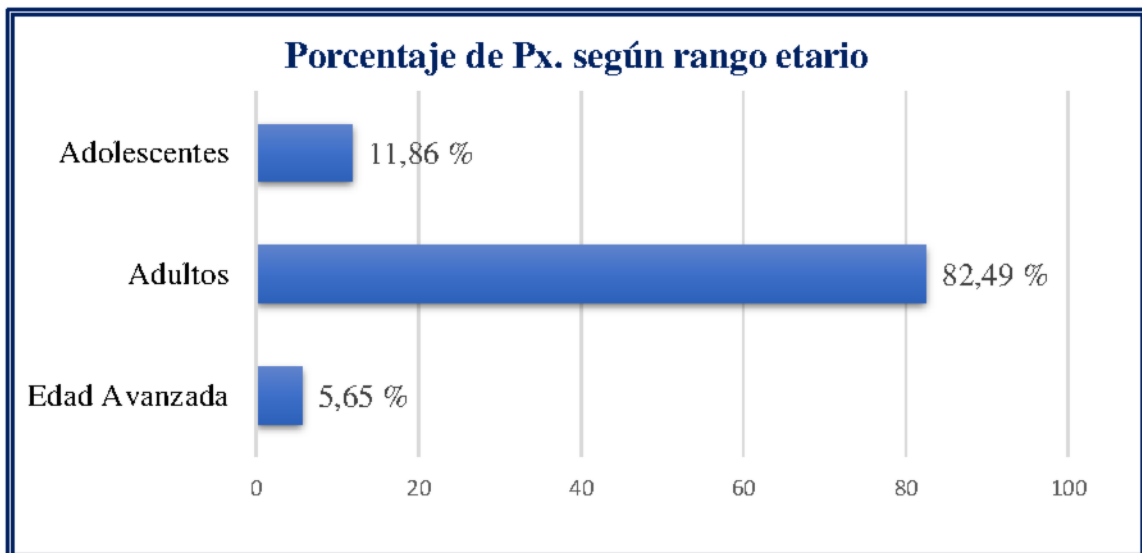


Gráfico 1: Porcentaje de pacientes categorizados según rango etario, siendo Adolescentes entre 10 y 19 años; Adultos entre 20 y 59 años; y en Edad Avanzada mayores de 60 años según la OMS.

Como se puede observar en el *Gráfico 1*, de los 177 pacientes, 21 (11,86%) se encuentran en el rango de la adolescencia, 146 (82,49%) en el de adultos y 10 (5,65%) en edad avanzada, siendo la edad mínima evaluada los 14 años y la máxima 81 años.



Gráfico 2: Distribución del sexo de los pacientes, siendo 150 femeninos y 27 masculinos.

De todas las pacientes mujeres, 131 (87,33%) se encuentran en edad reproductiva, es decir entre los 15 y 44 años de edad, por lo que los datos de si las mismas se encontraban transitando un embarazo fueron los que se detallan a continuación. Cabe aclarar que, de todas ellas, 8 (6,11%) no se pudo realizar la investigación debido a la no congruencia de los datos personales.



Gráfico 3: Frecuencia de gestantes. De las 123 pacientes, 74 (60,16%) se encontraban cursando un embarazo a la hora del estudio y 49 (39,84%) no.

Es necesario mencionar que, de ellas, una no se encontraba embarazada, pero había tenido un hijo en Enero de 2022. Por otro lado, de todas las gestantes se presentó un caso reactivo correspondiente al 0,81% y el 99,19% restante fueron no reactivos. Además, es importante aclarar que en esta estadística fue agregada una paciente de 14 años de edad, ya que la misma se encontraba cursando un embarazo. Finalmente hubo un caso reactivo de una paciente en edad gestacional a la cual no se le pudo corroborar si se encontraba cursando un embarazo.

La distribución de embarazos según rango etario se presenta en la siguiente tabla:

	Rango etario	Cantidad de embarazadas	Porcentaje
Adolescentes	Menores de 19 años	13	17,57%
Adultas	19 a 29 años	39	52,70%
	30 a 39 años	19	25,68%
	Mayores de 40 años	3	4,05%

Tabla 2: Frecuencia de embarazos según rango etario.

Finalmente, la frecuencia de los servicios de las muestras remitidas del HEC fueron las siguientes: (Ver gráfico 4)

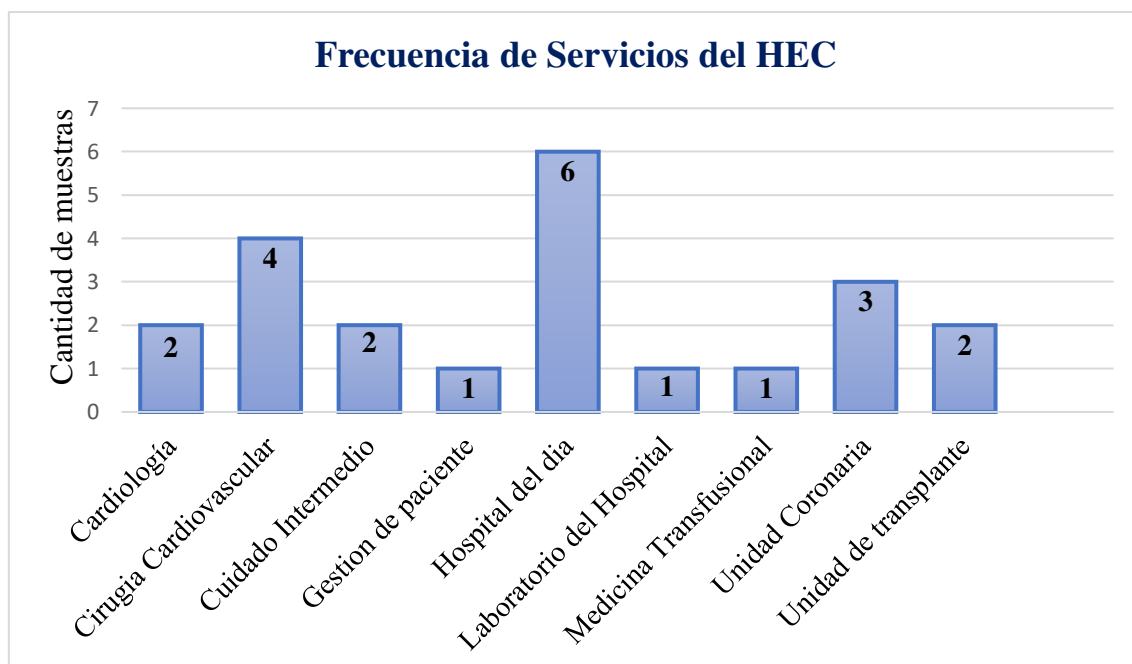


Gráfico 4: Cantidad de muestras remitidas según los servicios del HEC.

De los resultados propiamente dichos se detalla que de las 178 muestras procesadas hubieron 9 de ellas correspondientes al 5,06% que fueron informadas como reactivas, ya que tanto la ICT y el CMIA arrojaron resultados positivos. Del 94,94% restante, se presentaron 7 casos de discordancia y siguiendo el protocolo del HEC, se les realizó la APG como prueba confirmatoria, dando todas un resultado no reactivo y, por lo tanto, 169 muestras se validaron como no reactivas. La forma en que se dieron las discordancias se muestran a continuación: (Ver tabla 3)

	CMIA	ICT	APG
Discordantes	Zona gris	No reactivo	No reactivo
	No reactivo	Reactivo	No reactivo
	Reactivo	No reactivo	No reactivo
	Reactivo	No reactivo	No reactivo
	No reactivo	Reactivo	No reactivo
	Reactivo	No reactivo	No reactivo
	Reactivo	No reactivo	No reactivo

Tabla 3: Resultados de las muestras discordantes por CMIA e ICT y APG como prueba confirmatoria.

De los pacientes reactivos el 77,78% (7 muestras) son de sexo femenino de entre 25 y 52 años de edad, de las cuales, 6 (85,71%) corresponden a la localidad de Florencio Varela y la restante (14,29%) del Hospital de día del HEC. Por otro lado, una muestra (11,11%) pertenecía a un paciente de sexo masculino con 58 años de edad remitida por la Unidad Coronaria del HEC. Finalmente, la muestra restante (11,11%) era la correspondiente al PEEC.

Todas las muestras reactivas, también dieron reactivas por medio de la IFI, pero esta metodología arrojó 6 muestras reactivas más, de las cuales 3 corresponden a las muestras discordantes. Lo que denota una paradoja, ya que si el tercer método utilizado fuese la inmunofluorescencia, dichos pacientes tendrían resultados reactivos.

Si se desglosan los resultados por metodología se obtiene lo siguiente: (Ver tabla 4)

- ✚ El 92,13% de las pruebas por CMIA dieron no reactivas, mientras que el 7,87% reactivas.
- ✚ El 93,82% de las pruebas por ICT dieron no reactivas, mientras que el 6,18% reactivas.

- ✚ El 91,57% de las pruebas por IFI dieron no reactivas, mientras que el 8,43% reactivas.
- ✚ El 100% de los APG realizados dieron no reactivos.

Metodologías diagnósticas	Cantidad de muestras		
	No reactivas	Reactivas	Discordantes
CMIA	164	14	2
ICT	167	11	5
APG	7	0	-
IFI	163	15	-

Tabla 4: Muestras reactivas y no reactivas por determinación. Las discordantes corresponden a aquellas que dieron no reactivas cuando en su dupla metodológica dieron reactivas.

Esto conllevó a la realización de los cálculos de sensibilidad y especificidad del CMIA y la ICT frente a la IFI como prueba de referencia con los siguientes datos: (Ver tablas 5 y 6)

		IFI		
		Reactivos	No reactivos	Total
ICT	Reactivos	10	1	11
	No Reactivos	5	162	167
Total		15	163	178

Tabla 5: Presentación de resultados del estudio de valoración del Test Inmunocromatográfico.

Según los datos revelados, el Test Inmunocromatográfico posee una **Sensibilidad** de **66,67%** y una **Especificidad** de **99,39%** correspondientes a la validez de la metodología. Con respecto a la seguridad de la metodología se calculó que la probabilidad de que un resultado reactivo corresponda con un paciente enfermo (según IFI) es de 90,91% (Valor Predictivo Positivo), mientras que un resultado negativo refiera a un paciente sano es de 97,01% (Valor Predictivo Negativo).

		IFI		Total
		Reactivos	No reactivos	
CMIA	Reactivos	11	3	14
	No Reactivos	4	160	164
Total		15	163	178

Tabla 6: Presentación de resultados del estudio de valoración del Inmunoanálisis Quimioluminiscente de Micropartículas.

Según los datos revelados, el Inmunoanálisis Quimioluminiscente de Micropartículas posee una *Sensibilidad* de **73,33%** y una *Especificidad* de **98,16%** correspondientes a la validez de la metodología. Con respecto a la seguridad de la metodología se calculó que la probabilidad de que un resultado reactivo corresponda con un paciente enfermo (según IFI) es de **78,57%** (Valor Predictivo Positivo), mientras que un resultado negativo refiera a un paciente sano es de **97,56%** (Valor Predictivo Negativo).

Discusión

Es propicio aclarar que, de las metodologías aplicadas, tanto la ICT como la IFI tuvieron resultados reactivos débiles, 1 y 2 respectivamente, los cuales fueron considerados positivos.

Por otro lado, al analizar la seguridad de las metodologías, los valores de VPP y VPN fueron calculados a partir de los valores obtenidos de verdaderos positivos, verdaderos negativos, falsos positivos y falsos negativos considerando a la IFI como prueba de referencia, pero estos valores no dependen únicamente de la variable analítica sino también de la prevalencia de la enfermedad en la población y la correlación de los resultados con la clínica del paciente, datos de mayor relevancia, por lo que los resultados obtenidos son relativos y no absolutos.

Por otro lado, es relevante aclarar que en el Manual de Laboratorio para la IFI¹⁸ se recomienda determinar el título de la antigama globulina marcada para cada lote y para cada equipo microscópico, ya que depende del sistema óptico a utilizar, siendo el mismo, el correspondiente a la máxima dilución que da fluorescencia con el suero positivo en su título conocido, de forma que el conjugado no tiña de forma inespecífica a los parásitos. En este trabajo, este paso no fue realizado, ya que al utilizar la dilución del fabricante no se observaron tinciones con el suero control negativo que pudiesen afectar la interpretación de los resultados.

De la misma forma, se recomendaba la titulación del Azul de Evans con el conjugado, ya que, al ser el colorante de contraste, la utilización del título óptimo favorece la discriminación de los sueros en estudio. Esta determinación no fue realizada por criterio bioquímico y por no observar interferencias en la observación de las improntas.

Finalmente, de las improntas utilizadas se pudo observar que la composición de las mismas pueden afectar los resultados, ya que con las negras se corría riesgo de que, luego de los lavados, el reactivo se corra hacia la división contigua. Por este motivo fueron utilizadas en forma de zigzag por recomendación bioquímica.

Conclusión

De acuerdo a los resultados obtenidos se denota que los pacientes reactivos corresponden al 5,06% de las muestras procesadas, siendo el 77,78% de sexo femenino, de las cuales, el 85,71% son pertenecientes a la localidad de Florencio Varela. Estos datos son comparables con los obtenidos en el Trabajo Final de Valdi, Mercedes⁸ quien determinó un valor de reactividad del 2,11% en 2020 con una mayor cantidad de muestras reactivas en la misma localidad. De esta comparación surge una variación creciente en el porcentaje de positividad, lo que puede explicarse por un aumento del número de casos con el paso de los años o por el cambio de las metodologías utilizadas, ya que en 2020 el HEC utilizaba la ICT WL Check Chagas y el CMIA en el equipo Architect ci 4000 también de la compañía Abbott. A su vez, la localidad de Florencio Varela continúa siendo la que mayor cantidad de muestras remite al HEC, con una frecuencia en la actualidad del 53,37%.

Por otro lado, en este trabajo se hizo hincapié en la importancia de la determinación del Chagas en aquellas pacientes que se encuentran cursando un embarazo, ya que de ser diagnosticado a tiempo su descendencia puede negativizar la parasitemia y la paciente disminuir los títulos serológicos con tratamiento. Esto fue demostrado con los resultados obtenidos ya que el 60,16% de las pacientes en edad fértil se encontraban gestando, lo que denota la importancia de su diagnóstico y el cumplimiento de la ley al realizarse el tamizaje en dichas pacientes.

Con respecto a IFI, ya que al no poder establecerse con certeza si los pacientes son chagásicos por falta de datos clínicos, la determinación de la validez de las metodologías se obtuvo que el Test inmunocromatográfico posee una sensibilidad del 66,67% cuando la declarada por el fabricante es del 99,3% y una especificidad del 99,39% cuando la declarada es del 100%. En el caso del Inmunoanálisis Quimioluminiscente de

Micropartículas, la sensibilidad arrojada por los estudios fue de 73,33% cuando la declarada por el fabricante es del 100% y una especificidad del 98,16% cuando la del fabricante varía entre el 99,96% y el 100% dependiendo de la categoría de las muestras. De esta manera, se puede observar que la metodología IFI es más sensible y específica en esta población, para estas metodologías.

Tanto para la ICT como el CMIA, la especificidad es mayor que la sensibilidad. Al tratarse de métodos de screening son utilizados como primera prueba diagnóstica y se caracterizan por una alta sensibilidad y VPN ya que se confía en un resultado negativo. En este caso, el VPN de la ICT fue de 97,01% y del CMIA de 97,56%, pero no se debe olvidar que estos valores se encuentran relacionados con la clínica del paciente, por lo que los resultados obtenidos son congruentes. Además, fueron obtenidos en comparación con una metodología de referencia y no con pacientes certeramente enfermos y sanos. Por otro lado, ambas metodologías son comparables entre sí y confirman el hecho de la necesidad de una tercera técnica diagnóstica sensible y específica para el “desempate” de las muestras discordantes.

Finalmente, es notable destacar que de las muestras discordantes existe discrepancia entre el APG y la IFI, ya que de las 7 muestras validadas como no reactivas, por IFI hubiera habido 3 que presentarían resultado reactivo de ser utilizada dicha técnica como tercera metodología de validación. Es por esto, que se concluye con que la Inmunofluorescencia es un método de confirmación más certero gracias a su sensibilidad y especificidad, aunque requiere de un mayor tiempo de procesamiento y posee un mayor costo.

Referencias Bibliográficas

- ¹ Sanmartino, Mariana ... [et al.] (2015). *Hablamos de Chagas: aportes para re-pensar la problemática con una mirada integral*. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).
- ² Belaunzarán, María Laura. (2015). *Enfermedad de Chagas: globalización y nuevas esperanzas para su cura*. Revista Argentina de Microbiología. [Archivo PDF] <https://www.redalyc.org/pdf/2130/213039768001.pdf>
- ³ Organización Panamericana de la Salud. (2018). *Guía para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad de Chagas*. Washington, D.C. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/49653>
- ⁴ Poder Legislativo Nacional (P.L.N). *Ley 26.281 de 2007*. Ley de prevención y control de todas las formas de transmisión de la enfermedad de Chagas, hasta su definitiva erradicación de todo el territorio nacional. Boletín Oficial 05/09/2007. <https://e-legis-ar.msal.gov.ar/htdocs/legisalud/migration/html/11447.html>
- ⁵ Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (Última revisión, 2019). *Parásitos – Tripanosomiasis americana (también conocida como enfermedad de Chagas)*. Biología. Consultado 11/03/2022. <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>
- ⁶ Pereyra, Nicolás A. (2018). *Efecto de la infección con Trypanosoma cruzi sobre los patrones de alimentación y de excreción/defecación de Triatoma infestans*. Universidad Nacional de Córdoba. <https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/6737/Tesina%20Pereyra%20Nicol%C3%A1s%20A..pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- ⁷ Dr. Cuba, César; Dra. Hidalgo, Solange E. y Colaboradores. (2010). *Curso sobre Enfermedades Vectoriales para Agentes Comunitarios en Ambiente y Salud. Módulo V: Chagas*. Ministerio de Salud de la Nación. [Archivo PDF] <https://bancos.salud.gob.ar/sites/default/files/2018-10/0000000172cnt-08-2-3-3-i-modulo-chagas.pdf>
- ⁸ Valdi, E. Mercedes. (2020). *Comparación de métodos inmunoserológicos en muestras de pacientes derivados de unidades sanitarias y HEC*. Universidad Nacional Arturo Jauretche.

- ⁹ Ministerio de Salud. *Resolución 867/2012*. Apruébase el Plan Nacional de Chagas 2011-2016. Boletín Oficial 27/06/2012.
<https://e-legis-ar.msal.gov.ar/hdocs/legisalud/migration/html/19503.html>
- ¹⁰ Loewy, Matías. (22 de agosto de 2019). Enfermedad de Chagas: la transmisión materna ya origina más casos que la vinchuca. *La Nación*. Consultado: 11/03/2022.
<https://www.lanacion.com.ar/salud/enfermedad-de-chagas-la-transmision-materna-ya-origina-mas-casos-que-la-vinchuca-nid2279701/>
- ¹¹ Dirección Nacional de Epidemiología y Análisis de Situación de Salud, Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatala Chabén”. (2018) *Enfermedad de Chagas. Guía para la atención al paciente infectado con Trypanosoma cruzi*.
- ¹² Instituto Nacional de Parasitología (INP) “Dr. Mario Fatala Chaben”; Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) “Dr. Carlos G. Malbrán”. *Enfermedad de Chagas*. Consultado 21/01/2022.
http://www.anlis.gov.ar/inp/?page_id=233
- ¹³ Álvarez, Martínez M J; Belhassen, García M, Flores; Chavez MD; Pérez de Ayala A, Sulleiro E. (2020). Diagnóstico de parasitosis importadas en España en Álvarez, Martínez M J (Coord.) y Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (Ed.). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. (Capítulo 69, pp. 28-41). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). [Archivo PDF]
<https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimiento69.pdf>
- ¹⁴ Ministerio de Salud y Acción Social. (1999). *Resolución Ministerial N°523/97*. Normas para el diagnóstico de la infección chagásica. (Segunda Edición). [Archivo PDF]
http://www.legisalud.gov.ar/pdf/msres523_1997_chagas.pdf
- ¹⁵ Instituto Nacional de Parasitología (INP) “Dr. Mario Fatala Chaben”. *Guía de procedimientos. Técnica: Inmunofluorescencia Indirecta FATALAKIT IFI*. [Archivo PDF]
- ¹⁶ Inserto Standard Diagnostics, INC. (SD) Bioline Chagas Ab Rapid. (2016). Para detección de anticuerpos contra *T. cruzi* en sangre total, plasma o suero.
- ¹⁷ Inserto Alinity Chagas Reagent Kit. (Revisado en 2020). Para la detección cualitativa de anticuerpos frente a *T. cruzi* en suero y plasma humanos.

- ¹⁸ Instituto Nacional de Parasitología (INP) “Dr. Mario Fatala Chaben”. (1999). *Diagnóstico en Parasitosis – Manual de Laboratorio*. (Primera Edición). [Archivo PDF]
- ¹⁹ Aberer, Jorgelina Elsa. (2019). *Control de calidad en pruebas cualitativas aplicado a pruebas serológicas*. Programa de Evaluación Externa de la Calidad, Fundación Bioquímica Argentina (FBA).