Guías clínicas de la enfermedad de Chagas. 2006

Comité de Parasitología, Departamento de Enfermedades Emergentes y Re-emergentes, MINSAL

Esta guía clínica elaborada por un comité de expertos convocados por el Ministerio de Salud de Chile durante el año 2006, será reproducido en Revista Chilena de Infectología en seis partes, que se enuncian a continuación.

- Parte I. Introducción y epidemiología (junio 2008)
- Parte II. Enfermedad de Chagas en el adulto, en la infancia y adolescencia (junio 2008)
- Parte III. Enfermedad de Chagas en donantes de banco de sangre (agosto 2008)
- Parte IV. Enfermedad de Chagas en inmunosuprimidos (agosto 2008)
- Parte V. Diagnóstico de laboratorio (octubre 2008)
- Parte VI. Tratamiento de la enfermedad de Chagas (octubre 2008)

Parte V. Diagnóstico de laboratorio

Comité de Parasitología, Departamento de Enfermedades Emergentes y Re-emergentes,
Ministerio de Salud de Chile*

*En orden alfabético:

Werner Apt B.,
Ingrid Heitmann G.,
M. Isabel Jercic L.,
Leonor Jofré M.,
Patricia Muñoz C. del V.,
Isabel Noemí H.,
Ana M. San Martín V.,
Jorge Sapunar P.,
Marisa Torres H. e
Inés Zulantay A.

Part V. Laboratory diagnosis of Chagas disease

In this fifth part of Guidelines for Chagas disease, diagnostic techniques for *Trypanosoma cruzi* infection in humans are reviewed, the interpretation of laboratory results and an algorithm for laboratory diagnosis in immunocompetent hosts are presented. Chagas disease may be diagnosed by three kinds of techniques: direct, which allow detect the presence of the parasite in different kind of samples; indirect, based on the search of immune specific response against *T. cruzi* antigens and molecular, which detect parasite genetic material. Direct techniques are utilized mainly in acute phase of disease, as the parasite is present in blood of infected host. These techniques do not require be confirmed by other methods. For chronic undetermined phase and for symptomatic phase it is recommended to use indirect techniques; generally, immunoassay techniques (ELISA) that detect IgG antibodies directed against *T. cruzi* antigens are performed. As false positive results are possible, a positive or undetermined result must be confirmed by at least another technique (indirect immunofluorescence or indirect hemmagglutination). In Chile, confirmation of infection is performed by the Instituto de Salud Pública National Reference Laboratory or at surrogate centers. Molecular methods may be used to make the diagnosis in acute or chronic phase of infection, with more accuracy in the acute phase, and it is mainly recommended to diagnose vertical transmission of *T. cruzi* as early diagnosis of congenital infection increases the possibility to cure the sibling and besides it is a good marker to evaluate the effectiveness of treatment.

Key words: Chagas disease, American Trypanosomiasis, diagnosis, laboratory techniques.

Palabras clave: Enfermedad de Chagas, tripanosomiasis americana, diagnóstico, técnicas de laboratorio.

Introducción

El diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas, puede realizarse por:

Métodos directos: Comprueban la presencia de *Trypanosoma cruzi* o su material genético en la muestra estudiada.

Métodos indirectos o serológicos: Evidencian la presencia de anticuerpos específicos contra *T. cruzi* en las muestras, las cuales pueden ser suero, LCR, humores del ojo, etc.

La elección del tipo de examen a solicitar dependerá de la fase clínica de la enfermedad. En la etapa aguda, los métodos de elección son los directos, puesto que tienen una alta sensibilidad, y en la fase crónica latente o indeterminada y crónica determinada, están indicados los métodos indirectos o serológicos.

Período óptimo para la toma de muestra

Etapa aguda. Los métodos directos deben realizarse precozmente después de ocurrida la primoinfección; en cambio, el estudio indirecto debe realizarse después de 15 días.

En recién nacidos con sospecha de infección congénita, las muestras del binomio madre-hijo deben ser tomadas simultáneamente.

Etapa crónica latente o indeterminada y crónica determinada: los métodos indirectos o serológicos se pueden tomar en cualquier momento de la etapa crónica. También pueden ser útiles los exámenes directos, aunque presentan una menor sensibilidad.

Fundamento de las técnicas utilizadas

Se hace referencia a las técnicas disponibles en el país, las que deben ser solicitadas frente a la sospecha de un paciente infectado.

Diagnóstico parasitológico directo

- **Observación microscópica al fresco.** Identifica, por observación directa, la presencia de tripomastigotes de *T. cruzi* en una muestra de sangre periférica fresca.
- **Gota gruesa.** Permite la concentración de la muestra de sangre. Se colocan tres a cuatro gotas de sangre sin anticoagulante en un portaobjeto, las que luego se desfibrinan para posteriormente teñirse y ser observadas al microscopio.

- **Método de concentración: MicroStrout.** Examen microscópico de la fracción leucoplaquetaria de la sangre total a partir de un microhematocrito del paciente, en búsqueda de las formas tripomastigotas de *T. cruzi*.
- **Xenodiagnóstico.** Búsqueda de formas tripomastigotas de *T. cruzi* en deyecciones de triatomíneos que han succionado sangre de pacientes. Se utilizan para ello, ninfas de insectos libres de infección. Es útil en todas las etapas de la enfermedad, con una sensibilidad aproximada de 98 a 100% en la etapa aguda y de 50 a 70% en la etapa crónica en condiciones óptimas.
- **Reacción de polimerasa en cadena (RPC).** Técnica de biología molecular que utiliza partidores específicos para amplificar un segmento del ADN de *T. cruzi* en muestras clínicas de pacientes. Es útil para ser empleadas en diferentes tipos de muestras y tejidos en fase aguda, latente y crónica. La RPC utilizada en nuestro medio otorga resultados cualitativos y es útil, en especial en hospederos inmunocomprometidos y en niños bajo un año de edad. La RPC cuantitativa permite medir la carga parasitaria circulante y es útil especialmente en los pacientes inmunocomprometidos y donantes de órganos, en los cuales la serología no resulta útil por bajos niveles de CD4. Con ella se puede monitorizar el tratamiento.
- **Biopsia.** En caso de pacientes con inmunosupresión grave debe contemplarse la posibilidad de efectuar una biopsia y visualizar el parásito en los tejidos.

Diagnóstico parasitológico indirecto

Estas técnicas permiten cuantificar la concentración de inmunoglobulinas y, de esta forma, monitorizar la respuesta inmunobiológica a las terapias, identificar reactivaciones y determinar la curación serológica en pacientes inmunocompetentes.

- **Aglutinación indirecta.** Este método se basa en la reacción de glóbulos rojos sensibilizados con *T. cruzi* que entran en contacto con anticuerpos específicos del parásito produciéndose aglutinación (reacción positiva).
- **Enzimoimmuno ensayo (ELISA).** Este método está basado en una técnica colorimétrica en la cual se adhiere antígeno del parásito a placas de poliestirenos, las que son expuestas al suero en estudio, adhiriéndose las inmunoglobulinas presentes, las que son evidenciadas por una segunda inmunoglobulina con una reacción colorimétrica.
- **Inmunofluorescencia indirecta (IFI).** Técnica que permite determinar la presencia de anticuerpos anti *T. cruzi* en diferentes muestras biológicas. Para es-

tos efectos, se preparan placas de vidrio con pocillos a las que se le adhieren epimastigotes de *T. cruzi* (parásito completo) obtenidas de cultivo. Si el suero del paciente tiene anticuerpos, se produce una reacción antígeno-anticuerpo, la que se detecta con la adición de un segundo anticuerpo marcado con sustancias fluorescentes. Esta reacción se observa posteriormente en un microscopio de fluorescencia.

Muestras requeridas

Diagnóstico parasitológico directo

- **Observación microscópica al fresco.** 2 ml de sangre total con anticoagulante.
- **Gota gruesa.** Sangre, sin anticoagulante, obtenida por punción venosa o digital. Tres a cuatro gotas por preparación. Se deben realizar a lo menos cuatro preparaciones por paciente.
- **Método de concentración de MicroStrout.** Muestra de sangre recogida por punción digital en a lo menos seis capilares heparinizados, o sangre venosa tomada con anticoagulante.
- **Xenodiagnóstico.** El paciente inmunocompetente debe someterse a la picadura de triatomíneos libres de la parasitosis, por aproximadamente 20 min. En niños y personas inmunodeprimidas, este examen ha sido reemplazado en la actualidad por RPC.
- **Reacción de polimerasa en cadena (RPC).** Sangre total con anticoagulante en cantidad mínima de 1 ml. Se excluye el uso de heparina. También se puede recolectar sangre total con guanidina (1:4) y sangre en papel filtro.

Diagnóstico parasitológico indirecto

- **Aglutinación indirecta**
- **Enzima immuno ensayo (ELISA)**
- **Inmunofluorescencia indirecta (IFI)**

Para todas estas técnicas se requiere suero o plasma en cantidad mínima de 2 ml.

Conservación y transporte de las muestras

Sangre total para métodos directos

- Conservación a 4 °C, por un máximo de 3 días.
- Transporte en tubo plástico con tapa hermética, con las medidas necesarias de bioseguridad y mantención de temperatura.

Suero o plasma para métodos indirectos

- Conservación a 4 °C, por un máximo de 5 días o congelada a -20 °C.

- Transporte en tubo plástico estéril con tapa hermética, con las medidas necesarias de bioseguridad y cadena de frío.

Informe de resultados

Se recomienda usar el siguiente criterio para informar los resultados de los exámenes:

Diagnóstico parasitológico directo

Observación microscópica al fresco.

Gota gruesa.

Método de concentración de MicroStrout

Negativo: No se observan tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

Positivo: Presencia de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

Xenodiagnóstico

Negativo: No se observan tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

Positivo: Presencia de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

Reacción de polimerasa en cadena (RPC)

Negativo: No se observa la banda específica de *T. cruzi*.

Positivo: Se observa la banda específica de *T. cruzi*.

Diagnóstico parasitológico indirecto

Aglutinación indirecta

Negativa: No se evidencian anticuerpos específicos anti-*Trypanosoma cruzi*.

Positiva: Se evidencian anticuerpos específicos contra *Trypanosoma cruzi*.

ELISA

Negativa: No se evidencian anticuerpos específicos anti-*Trypanosoma cruzi*.

Positiva: Se evidencian anticuerpos específicos contra *Trypanosoma cruzi*.

Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Negativo: Título < 1/20 DO

Positivo: Título $\geq$ a 1/20 DO

Interpretación de resultados

Diagnóstico directo

Resultado positivo. La observación microscópica de formas de *T. cruzi*, en cualquiera de los métodos parasitológicos directos descritos, deberá considerarse diagnóstico de certeza de infección por este protozoo.

Resultado negativo. No descarta la presencia del parásito en la muestra, ya que estos métodos tienen diferentes niveles de sensibilidad analítica. Además, existen otras variables que intervienen en la sensibilidad biológica, como por ejemplo: carga parasitaria, etapa de la infección e inmunocompetencia del paciente. En pacientes chagásicos crónicos, los métodos directos, en general tienen baja sensibilidad; no obstante, la técnica de RPC ha demostrado una mayor sensibilidad que el resto de los exámenes directos.

Diagnóstico indirecto

Resultado positivo. Los métodos serológicos mencionados, tienen alta sensibilidad y especificidad en inmunocompetentes. Las muestras que resulten positivas deben ser enviadas al Laboratorio de Referencia de Parasitología del Instituto de Salud Pública (ISP) o a los centros autorizados por éste para su confirmación. En el caso de donantes chagásicos provenientes de tamizaje (ELISA-IFI), siempre debe realizarse una contramuestra.

Resultado negativo. Debido a las características de sensibilidad y especificidad de las técnicas serológicas en la etapa crónica, el resultado negativo en paciente inmunocompetente, tiene alta probabilidad de descartar la infección. Aún así, a nivel mundial, se recomienda realizar siempre dos técnicas serológicas complementarias para IgG *T. cruzi* en forma paralela. De preferencia se sugiere usar ELISA e IFI.

Figura 1. Algoritmo para el diagnóstico de laboratorio de enfermedad de Chagas en pacientes inmunocompetentes.

En la etapa aguda, es necesario repetir un examen serológico negativo, puesto que es posible que no se detecten los anticuerpos específicos IgG antes de los 15 días de producido el ingreso de *T. cruzi* al organismo.

Algoritmo diagnóstico

Algoritmo para métodos directos. Los exámenes directos en que se compruebe la presencia del parásito, podrán ser informados sin necesidad de confirmación del resultado por otro método. En caso de duda del diagnóstico directo, la muestra deberá ser enviada al Laboratorio de Referencia de Parasitología del ISP o en centros confirmatorios autorizados por éste.

Algoritmo para métodos indirectos. En el caso del diagnóstico de tamizaje en bancos de sangre o laboratorios clínicos, se deberá seguir el algoritmo expuesto en la Figura 1.

Se entenderá por examen de tamizaje la determinación de anticuerpos anti *T. cruzi* realizada mediante técnicas de ELISA o aglutinación en los bancos de sangre y laboratorios clínicos del país, tanto públicos como privados.

Se entenderá como exámenes de confirmación aquellos realizados por el Laboratorio de Referencia de Parasitología del Instituto de Salud Pública (ISP) o bien en centros autorizados por éste.

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

Resumen

En esta quinta parte de las Guías Clínicas de enfermedad de Chagas, se revisa el diagnóstico de la infec-

ción por *Trypanosoma cruzi* en humanos, la interpretación de los resultados y un algoritmo de diagnóstico de laboratorio en inmunocompetentes. La enfermedad de Chagas se puede diagnosticar por medio de tres tipos de técnicas: *directas*, que permiten evidenciar la presencia del parásito en diferentes tipos de muestras; *indirectas*, que corresponden a la búsqueda de anticuerpos específicos contra antígenos de *T. cruzi* y *moleculares*, basadas en la detección del material genético del parásito. Las técnicas directas se emplean, de preferencia, en la fase aguda de la enfermedad, donde es posible detectar al parásito circulando en el torrente sanguíneo de la persona infectada. Estas técnicas no requieren ser confirmadas por otros métodos. Para la fase crónica indeterminada y para la fase sintomática es recomendado el uso de las técnicas indirectas; generalmente se emplean técnicas de inmunoensayo (ELISA) que detectan anticuerpos de tipo IgG contra antígenos de *T. cruzi*. Por la posibilidad de reacciones falsas positivas, la recomendación es que los resultados positivos o indeterminados sean confirmados con, a lo menos, otra técnica diferente (inmunofluorescencia indirecta o hemaglutinación indirecta). En Chile la confirmación es realizada por el Laboratorio Nacional de Referencia del Instituto de Salud Pública y los centros autorizados por éste. Los métodos moleculares pueden ser empleados para el diagnóstico en fase aguda o crónica, teniendo mayor rendimiento en la primera, y su uso es recomendado principalmente como apoyo para la pesquisa de hijos de madres infectadas en la transmisión transplacentaria de la infección donde el diagnóstico precoz aumenta las posibilidades de cura del niño y es un buen marcador para evaluar el éxito del tratamiento.

Referencias

- 1.- República de Chile, Ministerio de Salud. División Programas de Salud. Departamento de Epidemiología. Norma sobre exámenes microbiológicos obligatorios a realizar a toda la sangre donada para transfusiones y otros aspectos relacionados con la seguridad microbiológica de la sangre. 19 diciembre 1995.
- 2.- Atías A. *Trypanosoma cruzi* y transfusión sanguínea. En Taller sobre Erradicación o Control de la Enfermedad de Chagas en Chile. Sociedad Chilena de Parasitología, Colegio Médico de Chile AG, 26-30 Agosto, 1991.
- 3.- Chagas C. Una nueva entidad mórbida: informe de estudios etiológicos y clínicos. En El Desafío de la Epidemiología: Problemas y Lecturas Seleccionadas. Organización Panamericana de la Salud Publicación Científica 505, 1991; 83-4.
- 4.- Freilij H, Altchen J. Congenital Chagas disease diagnostic and clinics aspects. Clin Infect Dis 1995; 21: 551-5.
- 5.- García A, Bahamonde M, Verdugo S, Correa J, Pastene C, Solari A, et al. Infección transplacentaria por *Trypanosoma cruzi*. Rev Méd Chile 2001; 129: 330-2.
- 6.- Gobierno de Chile. Ministerio de Salud. Unidad de Medicina Transfusional. Norma para la selección de donantes de sangre, marzo del 2000.
- 7.- WHO 2002. Control of Chagas disease. WHO Technical Report Series N-905 Geneva.
- 8.- Ribeiro-dos-Santos G, Nishiya A S N I, Sabino E C, Chamone D F, Sáez-Alquezar A. An improved PCR-based strategy for the detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples. Ann Trop Med Parasitol 1999; 93: 689-94.
- 9.- Schijman A G, Vigliano C, Burgos J, Favoloro R, Perrone S, Laguens R, et al. Early diagnosis of recurrence of *T. cruzi* infection by polymerase chain reaction after heart transplantation of chronic Chagas' heart disease patient. J Heart Lung Transplant 2000; 19: 1114-7.
- 10.- Torres M. Un mirada desde la salud pública al donante de sangre infectado con *T. cruzi*. Tesis de Magister en Salud Pública, mención Epidemiología. Escuela de Salud Pública Universidad de Chile, 2006.