

Lineamiento para la vigilancia por laboratorio de la enfermedad de Chagas en fase aguda.

Resumen

El Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) – Grupo de Parasitología al emitir este nuevo lineamiento de diagnóstico, pretende establecer un único mecanismo para el abordaje de todos los casos de la Enfermedad de Chagas en fase aguda a nivel Nacional. Unificando los métodos de diagnóstico parasitológico que se deben emplear, haciendo énfasis en el método de concentración micrométodo, para ser utilizado sin excepción alguna de manera seriada, además de proveer la información útil para la atención desde el Laboratorio en estos casos.

Maryi Lorena Segura
msegurs@ins.gov.co

Créditos

MARTHA LUCÍA OSPINA MARTÍNEZ

Directora General

ASTRID CAROLINA FLÓREZ SÁNCHEZ

Directora Técnica de Redes en Salud Pública

CLARA DEL PILAR ZAMBRANO HERNANDEZ

Subdirectora Laboratorio Nacional de Referencia

Elaborado por

MARYI LORENA SEGURA ALBA

Dirección de Redes en Salud Pública

Revisado por

JESSICA PAOLA BAUTISTA SILVA

Dirección de Redes en Salud Pública - Contratista

MARTHA STELLA AYALA SOTELO

Coordinadora Grupo de Parasitología

LILIANA JAZMIN CORTES CORTES

Dirección Redes en Salud Pública

RICARDO ANDRÉS CAICEDO DÍAZ

Referente Nacional de Vigilancia de Enfermedad de Chagas

Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo

©

Instituto Nacional de Salud

Bogotá, Colombia

Av. Calle 26 No. 51-20

Tabla de contenido

1. Objetivo	4
2. Alcance.....	4
3. Introducción.....	4
4. Pruebas parasitológicas directas.....	4
4.1 Método de concentración micrométodo	5
4.2 Método de concentración microhematocrito	6
4.3 Gota gruesa	7
4.4 Frotis o extendido de sangre periférica	7
4.5 Examen directo de sangre fresca.....	8
5. Diagnóstico por laboratorio en fase aguda y evaluación de seroconversión.....	8
6. Prueba parasitológica indirecta.....	8
6.1 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).....	8
7. Facturación de las pruebas de laboratorio	9
8. Resolución 1646 de 2018 y su anexo técnico	10
9. Documentación requerida.....	10
10. Algoritmo diagnóstico de Chagas agudo.....	11
11. Bibliografía.....	12

LINEAMIENTO PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN**FASE AGUDA****1. OBJETIVO**

Proporcionar los lineamientos técnicos para el fortalecimiento del diagnóstico parasitológico de la enfermedad de Chagas en fase aguda.

2. ALCANCE

El presente lineamiento técnico debe de ser empleado en el diagnóstico oportuno de la enfermedad de Chagas en fase aguda, a través del uso de métodos parasitológicos y seguimiento serológico en casos de brotes, en las Unidades Primarias Generadoras de Datos (UPGD) o Instituciones Prestadoras del Servicio (IPS) y las entidades territoriales del país acorde a las competencias definidas.

3. INTRODUCCIÓN

El agente causal de la enfermedad de Chagas es el protozoo *Trypanosoma cruzi*, la mayoría de las personas infectadas se encuentran en países de Latinoamérica. La infección se origina inicialmente con una fase aguda, la cual está caracterizada por una alta parasitemia, pero puede presentarse de manera asintomática, sin embargo cuando se presentan síntomas ocasiona fiebre, dolor de cabeza, mialgia, linfadenitis, hepatomegalia y esplenomegalia, posterior se presenta la fase crónica la cual se caracteriza por presentar patologías de tipo cardíaco y/o digestivas (1–3).

La enfermedad puede ser transmitida por diferentes vías: la vectorial, transmisión oral por el consumo de alimentos contaminados, transmisión materno-fetal, transmisión de manera accidental en trabajadores de la salud cuando manipulan muestras contaminadas o vectores infectados con el parásito y transfusión sanguínea (4,5).

La fase aguda de esta parasitosis puede pasar inadvertida o puede manifestarse de manera severa, por lo que la responsabilidad e importancia de un diagnóstico oportuno y eficiente puede llegar a evitar la mortalidad en la mayoría de los casos.

Toma de muestras

Las muestras pueden ser recolectadas por un profesional de la salud (Bacteriología Enfermería o Medicina) entrenados en su correcta manipulación y transporte. Se deben tener presente las medidas de bioseguridad y la utilización de los elementos de protección personal.

4. PRUEBAS PARASITOLÓGICAS DIRECTAS

Durante la fase aguda el diagnóstico se debe orientar al desarrollo de pruebas parasitológicas directas en busca del parásito (Tabla1):

- 4.1 Método de concentración micrométodo
- 4.2 Método de concentración microhematocrito
- 4.3 Gota gruesa
- 4.4 Frotis o extendido de sangre periférica.
- 4.5 Examen directo de sangre fresca.

El parásito puede estar en circulación durante los primeros 30 a 60 días, en ocasiones inclusive hasta los 90 días posterior a la infección o a la aparición de los primeros síntomas, al pasar el tiempo la concentración del parásito va disminuyendo, cada prueba tienen una sensibilidad diferente la cual aumenta significativamente al realizarlas todas en conjunto, razón por la cual es recomendable realizar todas las técnicas parasitológicas, especialmente los métodos que concentran los parásitos, así mismo es importante tener presente **el realizar todos los métodos de manera seriada** (Seriado a lo largo del tiempo 12, 24 u 48 horas, con frecuencia estimada por la clínica del paciente o **por al menos durante una semana, especialmente cuando el paciente tenga parasitológicos negativos pero persista con los síntomas y cuenta con algún nexo epidemiológico**) (6,7).

Tabla 1. Muestras para ensayos parasitológicos directos

Técnica a realizar	Momento de toma de la muestra según fase de Enfermedad	Tipo de muestra, conservación y transporte
Métodos de Concentración y/o microhematocrito,	Fase aguda (tomar muestra inmediatamente se tenga la sospecha clínica, cuando el resultado sea negativo se debe realizar	Sangre total obtenida por venopunción en tubos con EDTA (5 mL), transportar a 4 a 8 °C con refrigerantes. Nota: la visualización de los tripomastigotes depende de la parasitemia, por lo tanto, el método se debe realizar en un periodo <u>no mayor a 4 horas después de la extracción de la muestra.</u>
Gota Gruesa (GG) y/o Frotis de Sangre Periférica (FSP) coloreados con colorantes derivados de Romanowsky o el mismo Romanowsky modificado.	parasitológicos seriados a las 12, 24 u 48 horas, con frecuencia estimada por la clínica del paciente)	Sangre capilar obtenida por punción digital para GG y FSP y/o Sangre total obtenida por venopunción en tubos con EDTA (5 mL), para realizar las láminas de manera inmediata. El transporte de las láminas se debe hacer a temperatura ambiente protegidas de su posible ruptura.

Fuente: GUÍA PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DEL *Trypanosoma cruzi*. – INS (16)

4.1 Método de concentración micrométodo

Es el método de elección para el diagnóstico parasitológico, mediante el cual se aumenta la probabilidad de visualizar el parásito cuando se implementa de **manera seriada** (entre mayor número de veces se realice con la misma o diferente muestra a lo largo del tiempo, mayor es la posibilidad de encontrar el parásito esto depende de la frecuencia estimada por la clínica del paciente), durante la sospecha de la fase aguda de esta enfermedad.

Se deben tomar 500µL aproximadamente de sangre total venosa con anticoagulante (EDTA) en un vial pequeño (tubo para centrífuga de 1,5 mL), mezclar por inversión, centrifugar 1 minuto a 3000 r.p.m. Tomar con una pipeta la interfase que corresponde a la capa leucoplaquetaria (figura 1), aproximadamente de 10 µl a 15 µl, depositarla en una lámina portaobjeto, cubrir con una laminilla cubreobjetos, dejar en reposo durante 1 minuto y observar con objetivo de 10x y 40x. Se recomienda realizar una observación de la totalidad del diámetro de la laminilla (16).

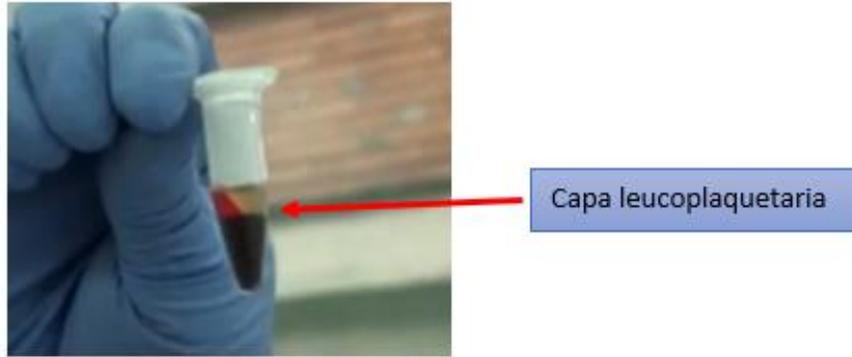


Figura 1. Capa leucoplaquetaria
Fuente: Grupo de Parasitología. LNR

Se envía el enlace correspondiente al micrométodo para su consulta:

<https://www.ins.gov.co/Direcciones/RedesSaludPublica/Paginas/Parasitolog%C3%ADa.aspx>

4.2 Método de concentración microhematocrito

Corresponde a una técnica de concentración que consiste en llenar mínimo 6 capilares heparinizados con sangre capilar o sin heparina con sangre venosa, posteriormente centrifugar a 8.000-12.000 r.p.m. dependiendo de la microcentrifuga (5-8 min). Los tripanosomas se ubicarán entre los glóbulos blancos y el plasma y se podrán observar en esta interfase leucoplaquetaria pegando el capilar con una cinta a un costado de una lámina portaobjeto observándolo con objetivo de 40X buscando la presencia de tripomastigotes en movimiento.

Si a pesar de esto no se observan, romper el capilar con precaución, exactamente en el punto donde se observa la interfase leucoplaquetaria con un lápiz de punta de diamante o el borde de una lámina porta objeto, verter el contenido sobre una lámina para observar al microscopio entre lámina y laminilla, posterior a la lectura, se puede retirar la laminilla con precaución, dejar secar, fijar con metanol y colorear con derivados de Romanowsky, Figura 2 (16).

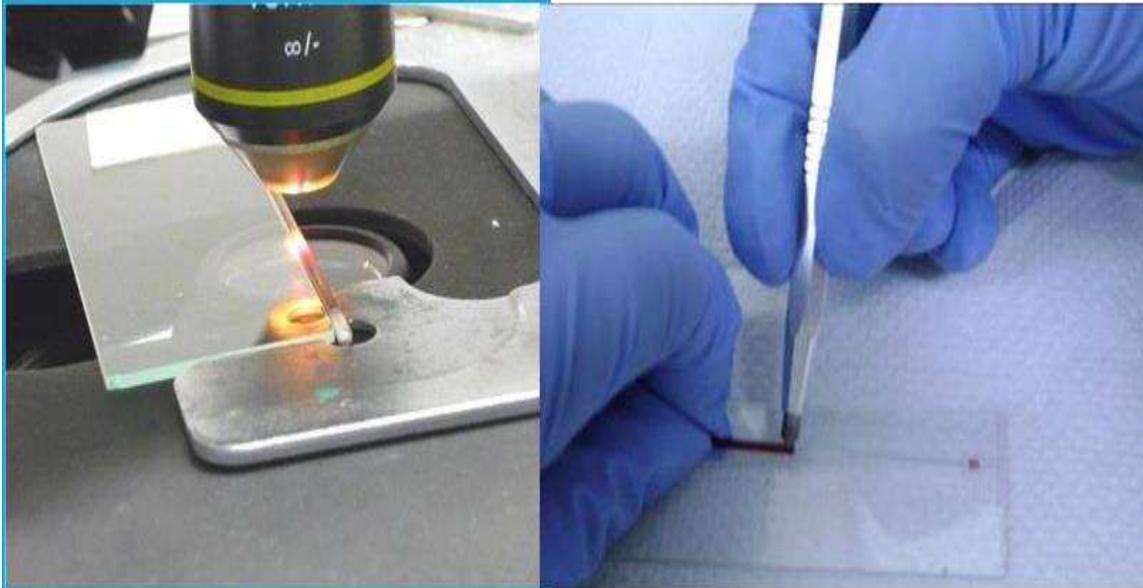


Figura 2. Procedimiento de visualización y ruptura del microhematocrito
Fuente: GUÍA PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DEL *Trypanosoma cruzi*. – INS (16)

4.3 Gota gruesa

Se obtiene sangre periférica capilar o venosa, se realiza la gota gruesa, la cual permite concentrar varias capas de sangre (20-30 en relación con el extendido). Aunque los parásitos pueden verse levemente distintos por el proceso de deshemoglobinización y por el secado de las láminas, aun así, permite evidenciar el parásito identificándose cinetoplasto, núcleo y flagelo. La membrana ondulante no es fácilmente identificable, ya que durante el procedimiento puede llegar a deteriorarse, Figura 3(16).

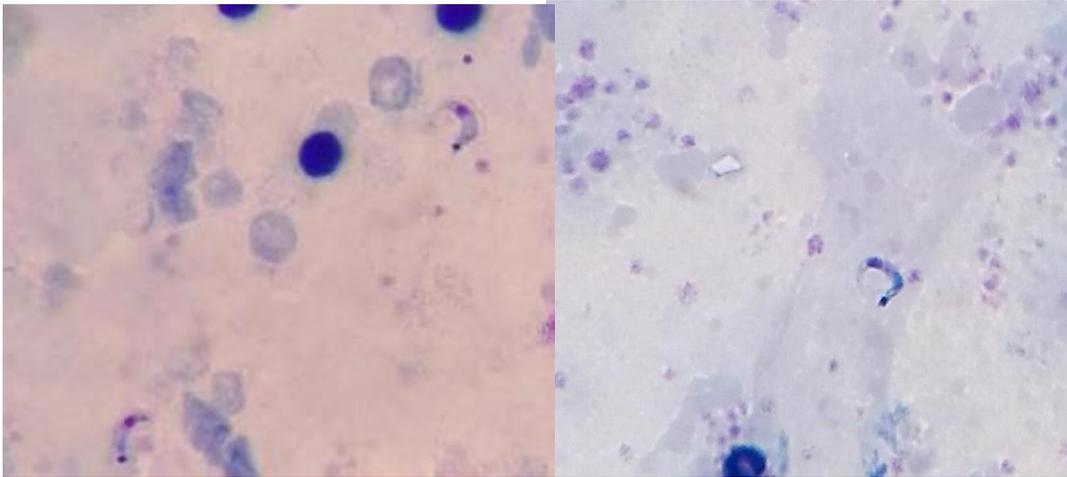


Figura 3. Tripomastigotes de *Trypanosoma sp.* en gota gruesa con coloración de Field.
Fuente: Grupo de Parasitología. LNR

4.4 Frotis o extendido a partir de sangre fresca

Se debe obtener sangre periférica capilar o venosa, se realiza el extendido sobre una lámina portaobjeto y se utilizan colorantes derivados de Romanowsky (Wright, Field, Giemsa), previa fijación con metanol. El parásito se observa con su morfología característica identificándose cinetoplasto, núcleo, flagelo y membrana ondulante, Figura 4 (16).

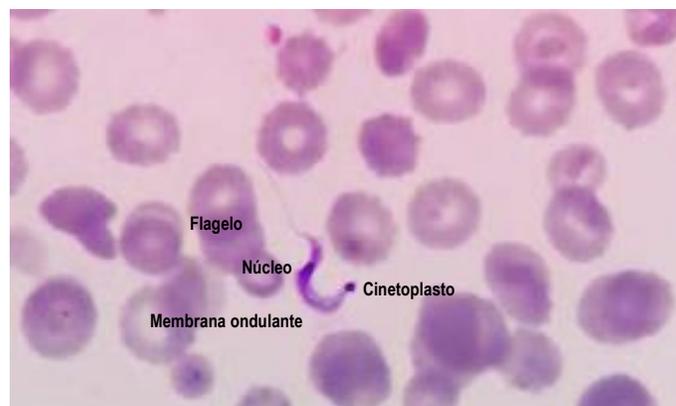


Figura 4. Tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* en frotis o extendido de sangre periférica con coloración de Field
Fuente: Grupo de Parasitología. LNR

4.5 Examen directo de sangre fresca

Se obtiene sangre capilar o venosa y se realiza la visualización de una gota entre lámina y laminilla con objetivo de 10x y 40x. Se observará el movimiento activo, ondulante y progresivo de los tripomastigotes de *Trypanosoma sp* (16).

5. DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO EN FASE AGUDA Y EVALUACIÓN DE SEROCONVERSIÓN.

Durante esta fase los métodos parasitológicos de concentración (**micrométodo y microhematocrito**) deberán ser los métodos de elección (12,13).

Un resultado **POSITIVO** en un método parasitológico directo confirma la infección, pero un resultado **NEGATIVO** no la descarta; razón por la cual los métodos parasitológicos directos se deben realizar de **manera seriada** (realizar pruebas a lo largo del tiempo con la misma o diferente muestra, frecuencia estimada por la clínica del paciente) por lo menos durante una semana. Es importante tener en cuenta que a todo caso probable de Chagas agudo por nexos epidemiológico se debe realizar de manera simultánea las pruebas serológicas para descartar seroconversión, la toma de suero **es útil para la confirmación diagnóstica y/o seguimiento serológico (ver algoritmo diagnóstico de Chagas agudo)**.

La muestra de suero debe mantenerse a temperatura de refrigeración o congelación según la capacidad y manejo de la muestra en el laboratorio responsable de la toma.

6. PRUEBA PARASITOLÓGICA INDIRECTA

Para la enfermedad de Chagas en fase aguda el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) del Instituto Nacional de Salud (INS) utiliza el método parasitológico indirecto en el marco de apoyo a brotes.

6.1 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

Este método es especializado, por lo tanto, se realiza bajo estrictas condiciones de laboratorio, con todos los criterios de estandarización, validación y control de calidad, por lo tanto, es responsabilidad del LNR.

El desarrollo de qPCR busca cuantificar la cantidad de parásitos de *Trypanosoma cruzi* presentes durante la fase aguda, es de gran utilidad en pacientes que han tenido resultados parasitológicos directos y serológicos negativos, que presentan un nexo epidemiológico fuerte y que persista la sospecha que pueden presentar la enfermedad de Chagas en fase aguda. Tabla 2 (8–11).

Se realiza mediante el ensayo de PCR en tiempo real con sondas Taqman (marcadas con dos fluorocromos)-qPCR Taqman Multiplex que permite la detección y cuantificación simultánea de ADN satelital de *T. cruzi* e insertado en un plásmido IAC (12).

Para realizar el diagnóstico por laboratorio de la enfermedad de Chagas se deben tener presente tres componentes fundamentales:

1. El epidemiológico contribuye a orientar el diagnóstico, a evaluar los factores de riesgo presentes en el paciente y a caracterizar variables de tiempo, lugar y persona para realizar un análisis íntegro de la situación.

2. El clínico: útil ante la sospecha de una fase aguda
3. El componente de laboratorio: que define o descarta una infección por parte del parásito *Trypanosoma cruzi* mediante pruebas parasitológicas y/o serológicas, o ambas (6,13).

Toma de muestras

La muestra se debe tomar en sangre total con anticoagulante EDTA, volumen a volumen (1:1) con clorhidrato de Guanidina 6M (tabla 2). (Ejemplo: 4mL de sangre total en EDTA+ 4mL de clorhidrato de guanidina 6M).

Tabla 2. Muestras para ensayos parasitológicos indirectos

Tipo de muestra, conservación y transporte	Momento de toma de la muestra según fase de Enfermedad	Técnica a realizar
Ensayos moleculares: Sangre total en EDTA, volumen a volumen en clorhidrato de Guanidina 6M. Indicación: Inmediatamente después de la toma de sangre con anticoagulante EDTA (mantener la relación 1:1, ejemplo: 4 mL de sangre total en EDTA con 4 mL de clorhidrato de guanidina 6M y transportar a temperatura ambiente (12°C con refrigerantes).	Fase aguda de posible transmisión vectorial, oral, transfusional o congénita y en casos especiales durante la fase crónica ante una reactivación.	Pruebas de biología Molecular para detección y cuantificación de ADN de <i>T.cruzi</i> .

Fuente: GUÍA PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DEL *Trypanosoma cruzi*. – INS (16)

7. FACTURACIÓN DE LAS PRUEBAS DE LABORATORIO

Mediante Resolución No.3495 de 2019 del Ministerio de Salud y Protección Social, por la cual se actualiza y se expide integralmente la clasificación única de procedimientos en salud – CUPS, acorde a la práctica clínica y las dinámicas en salud del país (tabla 3).

Tabla 3. Códigos CUPS para facturación de pruebas parasitológicas para Enfermedad de Chagas

CÓDIGO CUPS	PROCEDIMIENTO COMO APARECE EN LA RESOLUCIÓN	SOLICITUD MÉDICA
90.2.2.11	Hematocrito	Método de concentración
90.2.2.14	Hemoparásitos extendidos de gota gruesa	Gota gruesa para hemoparásitos
90.2.2.15	Hemoparásitos Extendido de Sangre periférica	Extendido de Sangre periférica para hemoparásitos
90.1.3.04	Examen directo fresco de cualquier muestra	Examen en fresco para <i>Trypanosoma</i>

Fuente: Resolución No.3495 de 2019 del Ministerio de Salud y Protección Social

8. RESOLUCIÓN 1646 DE 2018 Y SU ANEXO TÉCNICO.

A continuación, se relacionan las competencias propias de cada entidad de acuerdo a la resolución 1646 de 2018 del Instituto Nacional de Salud "Por la cual se especifican y orientan los exámenes de interés en salud pública que deben realizar los laboratorios de salud pública (LSP) departamental y distrital y la interacción en las actividades de referencia y contra referencia con la red de laboratorios, de acuerdo a los lineamientos del Laboratorio Nacional de Referencia" (tabla 4):

Tabla 4. Competencias propias de cada entidad de acuerdo a la resolución 1646 de 2018 del Instituto Nacional de Salud

Laboratorios prestadores de la red departamental o distrital	LDSP y Distrital	Laboratorio Nacional de Referencia de Parasitología INS
<ul style="list-style-type: none"> Realizar las pruebas de diagnóstico directas e indirectas acorde a sus competencias Disponer del diagnóstico integral de la enfermedad de Chagas. 	<ul style="list-style-type: none"> Realizar el <u>Control de Calidad</u> a los Exámenes Directos tomados por la Red Prestadora de su jurisdicción Participar oportunamente en los <u>Programas de Evaluación Externa Directa e Indirecta</u> del Desempeño de acuerdo a los lineamientos vigentes del LNR. Apoyar las <u>actividades de diagnóstico en situaciones de brote</u> o contingencias (Chagas agudo). <u>Capacitar a su Red</u>, para fortalecer la capacidad de respuesta. Disponer y realizar el <u>diagnóstico</u> de la enfermedad de Chagas. 	<ul style="list-style-type: none"> <u>Apoyar situaciones de brote</u> o contingencias cuando la DTS no cuenta con la suficiente capacidad de respuesta. <u>Realizar el control de calidad de pruebas diagnósticas en situaciones de brote</u> Realizar los ensayos necesarios para <u>resolver las discordancias</u> que se presenten. Liderar los <u>programas de Evaluación Externa del Desempeño (PEDD)</u> Realizar <u>vigilancia molecular</u> del parásito para apoyar la toma de decisiones de prevención y control en salud pública.

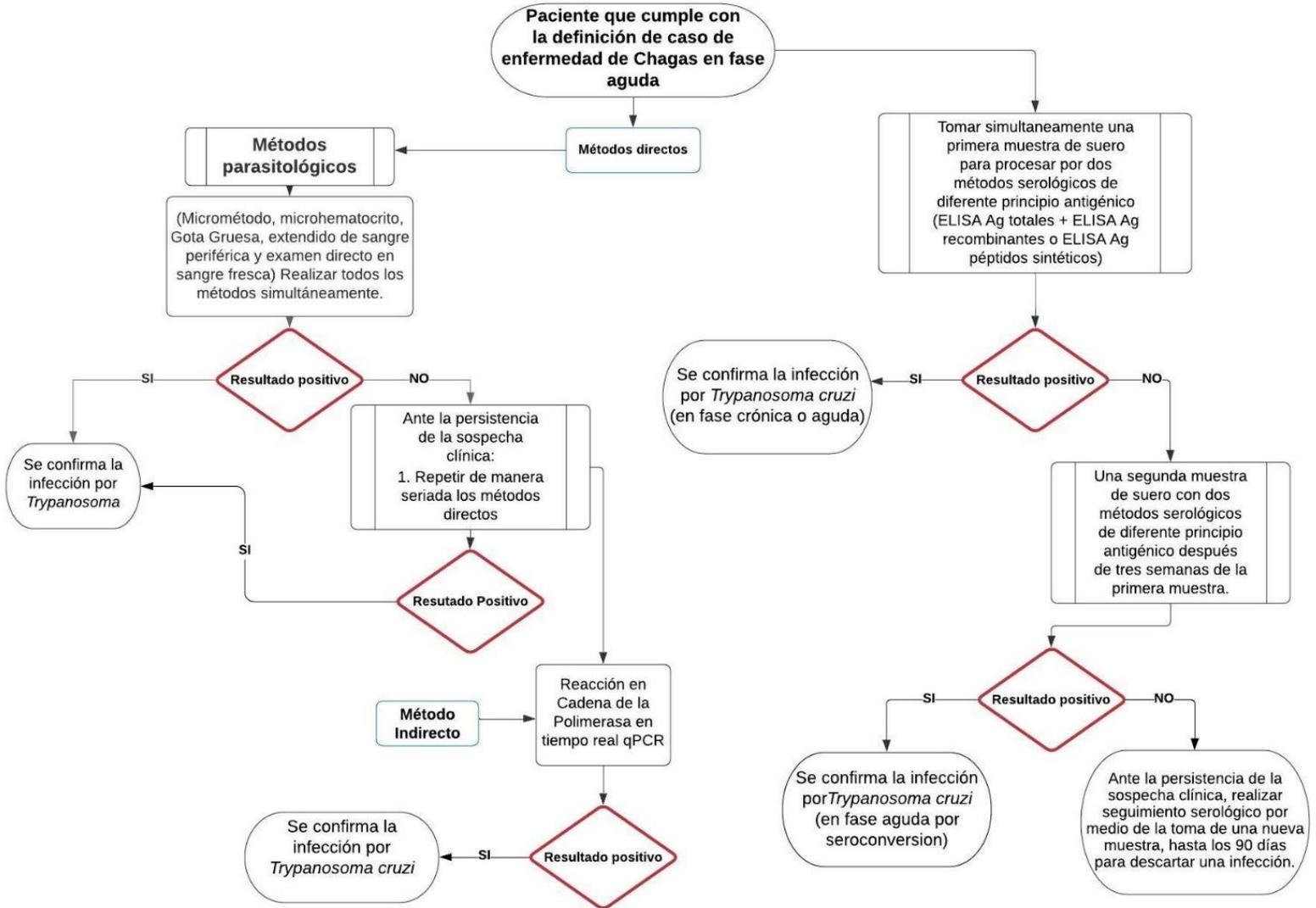
Fuente: Resolución 1646 de 2018 del Instituto Nacional de Salud

9. DOCUMENTACIÓN REQUERIDA

Las muestras remitidas al Grupo de Parasitología Laboratorio Nacional de Referencia del Instituto Nacional de Salud deberán enviarse junto con:

- Historia clínico-epidemiológica o un resumen de historia clínica que incluya datos demográficos. (nombre, identificación, tipo de identificación, edad, fecha y lugar de nacimiento, procedencia del caso, signos, síntomas y paraclínicos realizados)
- Ficha de notificación individual al SIVIGILA
- Exámenes paraclínicos realizados con los resultados respectivos.

10. ALGORITMO DIAGNÓSTICO DE CHAGAS AGUDO



BIBLIOGRAFÍA.

1. Beatriz A, Oliveira B De, Cesar K, Alevi C, Henrique C, Imperador L, et al. Parasite – Vector Interaction of Chagas Disease : A Mini-Review. 2018;98(3):653–5.
2. Guarner J. Chagas disease as example of a reemerging parasite. Semin Diagn Pathol [Internet]. 2019;0–1. Available from: <https://doi.org/10.1053/j.semdp.2019.04.008>
3. Flores-ferrer A, Marcou O, Waleckx E, Dumonteil E, Gourbière S. Evolutionary ecology of Chagas disease ; what do we know and what do we need ? 2018;(November 2017):470–87.
4. Dan L. Longo. Chagas' Disease. new engl J Med. 2015;
5. D.-A. Álvarez-Hernández,a, G.-A. Franyuti-Kellya, R. Díaz-López-Silvac, A.-M. González-Chávezd,e, D. González-Hermosillo-Cornejod,f RV-L. Chagas disease : Current perspectives on a forgotten. Rev Médica del Hosp Gen México [Internet]. 2018;81(3):154–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hgmx.2016.09.010>
6. Silveira CA, Abad Franch F, Schmunich GA, Luquetti AO. Programa Regional para el Control de la Enfermedad de Chagas en América Latina. Iniciativa de bienes públicos regionales. BID/OPS/IDRC/CNZ. Montevideo, Uruguay; 2010. 242 p.
7. FLAP. Congreso Latinoamericano de Parasitología. In Quito-Ecuador; 2013
8. República de Colombia. Ministerios de Salud y Protección Social. Guía de Atención Clínica de la enfermedad de Chagas 2010 (Documento Actualizado de Versión Convenio 256/09) [Internet]. 2010 [cited 2017 Jun 28]. Available from: https://www.minsalud.gov.co/Documentos_y_Publicaciones/Guía_de_atención_clínica_de_Chagas_2010.pdf
9. De D, Americana LT, Silvia B, Chirinos V, César D, Velarde N. MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO PARA EL. Chagas) [Internet]. 2006 [cited 2017 Jun 28]; 106(26). Available from: http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/Manual_Enfermedades_Chagas.pdf
10. InDRE - RNLSP. Lineamientos para la vigilancia por laboratorio de Enfermedad de Chagas [Internet]. 2012 [cited 2017 Jun 28]. Available from: http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Lineamientos_Chagas_Oct_2012.pdf
11. Instituto Nacional de Parasitología “Dr Mario Fatała Chabén”. Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación. Guía para la atención al paciente infectado con Trypanosoma cruzi [Internet]. Argentina; 2012. Available from: http://www.msal.gov.ar/chagas/images/stories/Equipos/Guia_Nacional_Chagas_version_27092_012.pdf
12. Hernández C, Cucunubá Z, Flórez C, Olivera M, Valencia C, Zambrano P, et al. Molecular Diagnosis of Chagas Disease in Colombia: Parasitic Loads and Discrete Typing Units in Patients from Acute and Chronic Phases. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2016 Sep [cited 2017 Jun 28];10(9):e0004997. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27648938>
13. Brener Z, Andrade ZA, Barral-Netto M. Trypanosoma cruzi e doença de Chagas. Second. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan SA
14. WHO. Centro de prensa La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). OMS - N°340. 2013;1–5

15. Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol* [Internet]. 2006 Dec [cited 2017 Jun 28]; 22(12):583–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492206002601>
16. Instituto Nacional de Salud. GUÍA PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DEL *Trypanosoma cruzi*. [Internet]. Colombia. Available from: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informacin%20de%20laboratorio/Guia%20para%20la%20Vigilancia%20por%20laboratorio%20de%20Trypanosoma%20cruzi.pdf>.