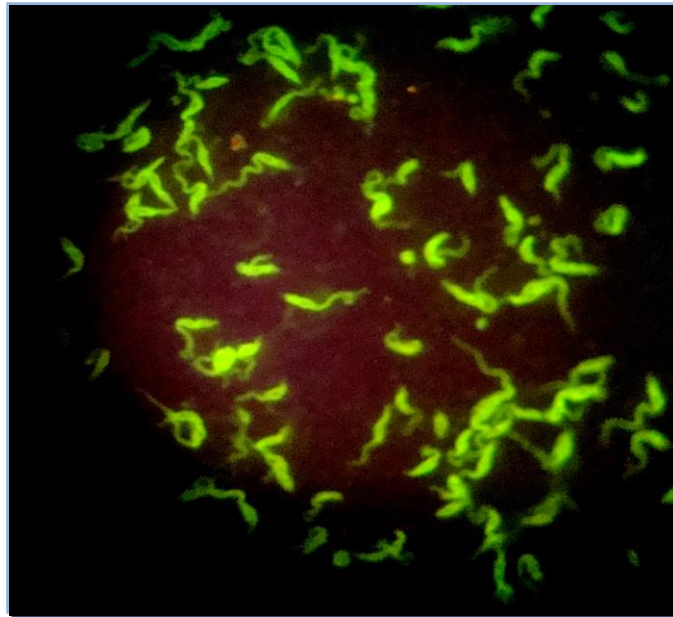


GUÍA PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DEL *Trypanosoma cruzi*



Epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (Tcl)
Fuente: Grupo de Parasitología. DRSP

DIRECCIÓN REDES EN SALUD PÚBLICA

SUBDIRECCIÓN LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA

GRUPO DE PARASITOLOGÍA 2017

Dirección

Martha Lucia Ospina
Director General Instituto Nacional de Salud

Coordinación

María Alexandra Durán Romero
Director Técnico (E)
Redes en Salud Pública

Rosa Elvinia Rodríguez Rodríguez
Subdirectora (E)
Laboratorio Nacional de Referencia

Martha Stella Ayala Sotelo
Coordinadora
Grupo de Parasitología
Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia
Dirección Redes en Salud Pública

Omayda Cárdenas Bustamante
Equipo Técnico
Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia
Dirección de Redes en Salud Pública

Elaborado por

Astrid Carolina Flórez Sánchez
Grupo de Parasitología
Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia
Dirección Redes en Salud Pública

Ricardo Andrés Caicedo Díaz
Grupo de Parasitología
Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia
Dirección Redes en Salud Pública

TABLA DE CONTENIDO

OBJETIVOS DE LA GUÍA	6
DEFINICIONES, SIGLAS, ABREVIATURAS Y ACRONIMOS.....	7
1. GENERALIDADES	8
1.1 Agente etiológico	8
Forma de amastigote:	8
Forma de epimastigote:.....	9
Forma de tripomastigote metacíclico:.....	9
1.2 Modo de transmisión.....	10
2.1 Bioseguridad	12
2.2 Toma de muestras.....	12
2.3 Tipo de muestra, conservación, almacenamiento y transporte	12
2.4 Documentación requerida	14
2.5 Métodos de laboratorio empleados para el diagnóstico del agente etiológico	14
2.5.1 Ensayos para fase aguda	14
2.5.1.1 Examen directo de sangre fresca.....	15
2.5.1.2 Frotis o extendido a partir de sangre fresca	15
2.5.1.3 Gota gruesa a partir de sangre fresca.....	16
2.5.1.4 Microhematocrito.....	17
2.5.1.5 Método de Strout.....	18
2.5.1.6 Micrométodo	19
2.5.1.7 Diagnóstico molecular de <i>T. cruzi</i>	19
2.5.1.8 Lineamientos para el diagnóstico por laboratorio en fase aguda	19
2.5.2 Ensayos para fase crónica.....	19
2.5.2.1 Ensayos de inmunodiagnóstico.....	21

2.5.2.1.1 ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay / Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzima) o EIA (Enzyme Immunoassay / Enzimo inmunoensayo).....	21
2.5.2.1.2 Quimioluminiscencia (ChLIA)	21
2.5.2.1.3 Inmunofluorescencia Indirecta o IFI	22
2.5.2.1.4 Hemaglutinación indirecta o HAI	22
2.5.2.1.5 Western Blot / Western blot /Inmunoblot o WB	23
2.5.2.1.6 Pruebas de Diagnóstico Rápido (PDR)	23
2.5.3 Interpretación de resultados	23
2.5.4 Forma de reporte de resultados y periodicidad	25
2.5.5 Facturación de las pruebas de laboratorio	25
2.5.6 Competencias de los laboratorios en el marco de la Red Nacional de Laboratorios	28
3. CONTROL DE CALIDAD.....	32
3.1.1 Programa de Evaluación Externa del Desempeño Directa - PEEDD	32
3.1.2 Programa de Evaluación Externa del Desempeño Indirecto - PEEDI	32
4. VIGILANCIA POR LABORATORIO DEL <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
5. ESTRUCTURA Y FUNCIONES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS (RNL) PARA EL EVENTO DE ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	33
5.1 Funciones del Laboratorio Nacional de Referencia (LNR).....	33
5.2 Funciones del laboratorio de Salud Pública (LSP).....	34
5.3 Funciones del laboratorio público y privado o referente para el evento en el nivel municipal y/o local según corresponda.....	34
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

Tabla de figuras

Figura 1. Amastigote de <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
Figura 2. Epimastigote de <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
Figura 3. Tripomastigote metacíclico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	10
Figura 4. Fundamento parasitológico y serológico del diagnóstico de la Enfermedad de Chagas ..	15
Figura 5. Trypomastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> en frotis o extendido de sangre periférica con coloración de Field	16
Figura 6. Trypomastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> en gota gruesa con coloración de Field	17
Figura 7. Procedimiento de visualización y ruptura del microhematocrito	18
Figura 8. Método de Strout.....	18
Figura 9. Técnica de Elisa para determinación de Ac Ig G anti <i>T. cruzi</i>	21
Figura 10. Técnica de IFI para determinación de Ac Ig G anti <i>T. cruzi</i>	22
Figura 11. Técnica de WB para determinación de Ac Ig G anti <i>T. cruzi</i>	23
Figura 12. Algoritmo diagnóstico de Chagas agudo	27
Figura 13. Competencias de los laboratorios.....	28
Figura 14. Algoritmo diagnóstico de Chagas crónico.....	30
Figura 15. Algoritmo diagnóstico de Chagas congénito.....	31

Tabla de tablas

Tabla 1. Muestras para ensayos parasitológicos directos	12
Tabla 2. Muestras para ensayos parasitológicos indirectos	13
Tabla 3. Muestras para ensayos de Inmunodiagnóstico	13
Tabla 4. Interpretación de resultados de pruebas serológicas	24
Tabla 5. Códigos CUPS para facturación de pruebas serológicas para Enfermedad de Chagas ...	25
Tabla 6. Códigos CUPS para facturación de pruebas parasitológicas para Enfermedad de Chagas	26

OBJETIVOS DE LA GUÍA

- Describir los lineamientos, sus actualizaciones el proceso de vigilancia por laboratorio del *Trypanosoma cruzi*.
- Establecer los procesos de obtención, conservación y transporte de las muestras para la detección del agente etiológico, el *Trypanosoma cruzi*.
- Describir los fundamentos técnico-científicos de los métodos de ensayos empleados para el diagnóstico por laboratorio del *Trypanosoma cruzi*.
- Describir los criterios técnico-operativos para la participación en el programa interlaboratorio de control de calidad para la evaluación del desempeño directo e indirecto y la participación en PEED nacionales e internacionales.
- Precisar cómo se articula la red nacional de laboratorios para la vigilancia por laboratorio del *Trypanosoma cruzi*, así como describir las funciones y responsabilidades en cada uno de los niveles.

ALCANCE

La presente guía aplica para la vigilancia por laboratorio del *Trypanosoma cruzi* en diferentes matrices y métodos con los cuales se detectan en el laboratorio nacional de referencia del INS.

DEFINICIONES, SIGLAS, ABREVIATURAS Y ACRONIMOS

Tripanosomiasis americana: conocida como Enfermedad de Chagas, es una infección humana producida por el parásito protozooario *Trypanosoma cruzi*, el cual es transmitido al hombre a través de insectos de la familia Reduviidae. La transmisión vectorial ocurre cuando el insecto pica y defeca dejando sus heces, las cuales contienen tripomastigotes metacíclicos infectivos, contamina una herida o membrana mucosa de ojos, nariz o boca.

Antígeno (Ag): molécula que al ser introducida en el organismo induce una respuesta inmune y da lugar a la formación de otras proteínas con las cuales reacciona específicamente llamadas anticuerpos.

Anticuerpo (Ac): molécula de inmunoglobulina producida por el sistema inmune como respuesta frente a la exposición a antígenos específicos. Cada anticuerpo es específico contra un antígeno.

Inmunoglobulina G (Ig G): anticuerpo o inmunoglobulina (Ig) producida por el sistema inmune como respuesta secundaria frente a la exposición a antígenos bacterianos, virales, parasitarios o a otras sustancias antigénicas. Se consideran anticuerpos de memoria, ya que permanecen presentes en la sangre de por vida, siendo el principal anticuerpo de defensa. Es el tipo de anticuerpos predominantes en los fluidos corporales como sangre y LCR. Dado que tiene bajo peso molecular puede atravesar varios tejidos, incluso la placenta, por lo cual en ocasiones el feto puede tener anticuerpos por transferencia materna sin que ello signifique en todos los casos contacto con una infección.

Serología: estudio realizado en muestras de suero, que permite corroborar la presencia de anticuerpos en sangre frente a la presencia de una infección.

Inmunodiagnóstico: sinónimo de serología, pero el estudio puede realizarse en fluidos diferentes a sangre.

Diagnóstico parasitológico: diagnóstico por laboratorio de pruebas encaminadas a la búsqueda del parásito.

Diagnóstico molecular: detección de ADN mediante amplificación y/o cuantificación de blancos de ADN de *T. cruzi*.

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

ELISA: Ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzima

EIA: Inmunoensayo

1. GENERALIDADES

1.1 Agente etiológico

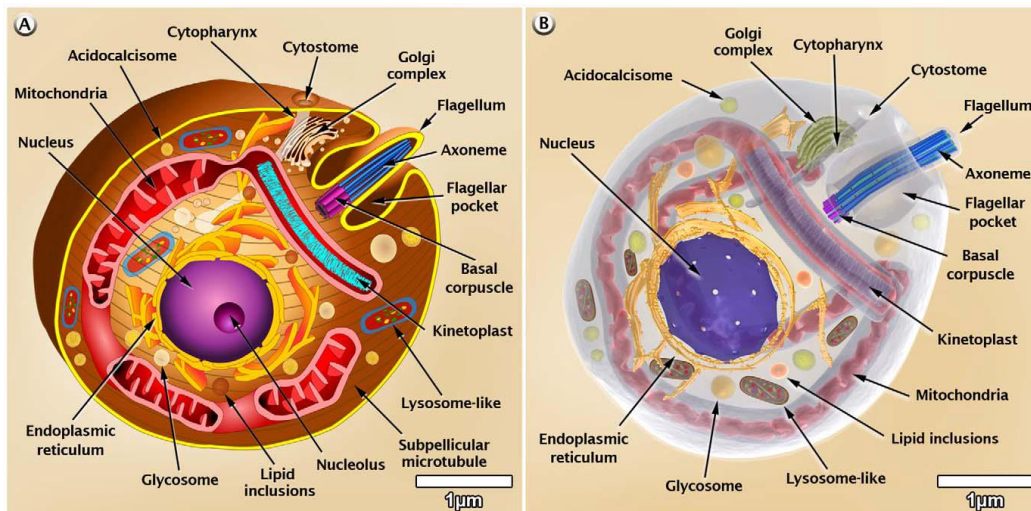
Trypanosoma cruzi pertenece al subphylum *Mastigophora* del phylum *Sarcomastigophora*, orden *Kinetoplastida*, que comprende organismos flagelados con un kinetoplasto, organelo localizado en la mitocondria, que contiene ADN. Su estadio infeccioso se desarrolla en el interior del tracto digestivo del vector y contamina a los hospederos mamíferos a través de sus heces. Asimismo, éste parásito al estar presente en sangre y/o secreciones de hospederos o reservorios infectados, puede contaminar alimentos y/o bebidas (1–3).

El *T. cruzi* es un parásito protozoo con una gran diversidad genética que permitió la conformación en seis grupos diferentes llamados DTUs (Unidades Discretas de Tipificación) nombrados TcI a TcVI. En Colombia, predomina el linaje TcI que circula en ciclos selváticos y domésticos (4,5).

Este parásito pasa por tres estadios morfológicos, llamadas también formas parasitarias:

Forma de amastigote: No flagelada e intracelular, es la forma replicativa, es redondeado u ovoide, mide aproximadamente de 1.5 a 4.0 μm , en él pueden apreciarse el núcleo, el cinetoplasto y el cuerpo basal, Figura 1.

Figura 1. Amastigote de *Trypanosoma cruzi*

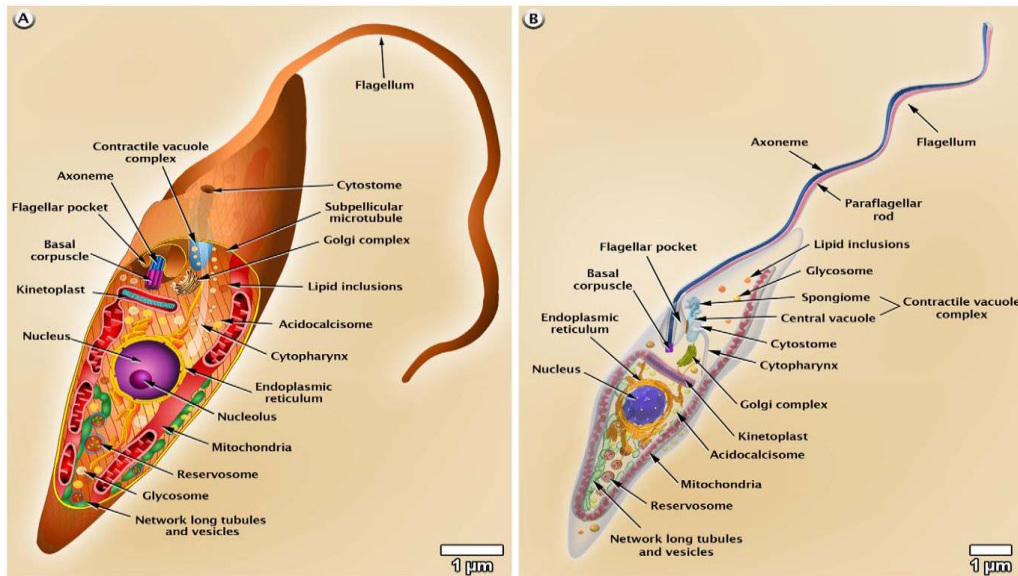


Fuente: Tomado de: *interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of Trypanosoma cruzi, the Causative Agent of Chagas Disease. PLOS. 2012. (6)*

Forma de epimastigote: Flagelar, prolifera en el insecto vector y corresponde a la forma que es inducida en el laboratorio a través de los cultivos. El cinetoplasto se encuentra entre el núcleo y el flagelo libre. La membrana ondulante es pequeña, Figura 2.

Sufren un proceso de metacicloogénesis mediante el cual las formas replicativas de *T.cruzi* (epimastigotes) se transforman en el estadio infeccioso (tripomastigotes metacíclicos), en la ampolla rectal del vector.

Figura 2. Epimastigote de *Trypanosoma cruzi*

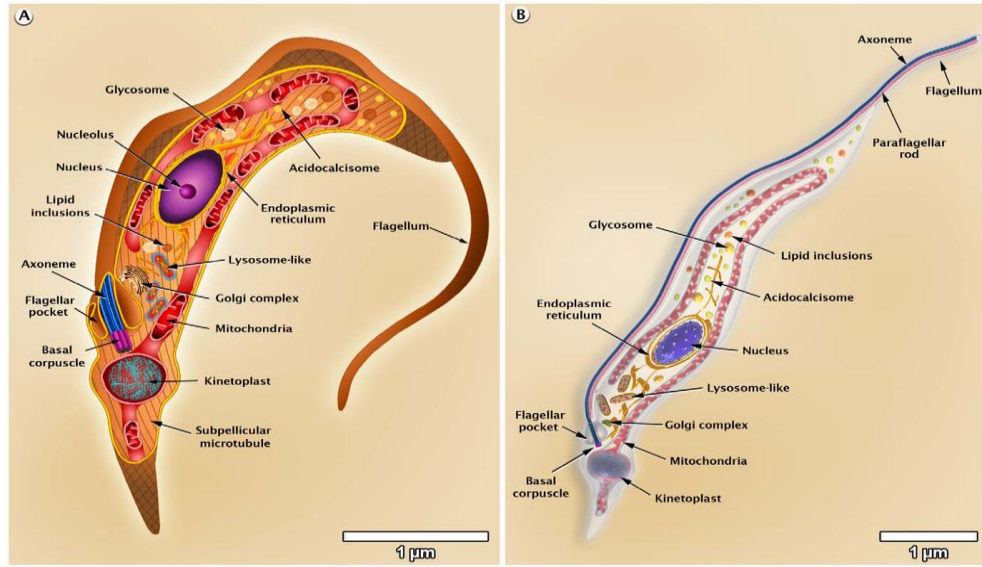


Fuente: Tomado de: *interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of Trypanosoma cruzi, The Causative Agent of Chagas Disease. PLOS. 2012. (6)*

Forma de tripomastigote metacíclico: corresponde a la forma infecciosa tanto para el vector como para los hospederos humanos y mamíferos.

Morfológicamente es fusiforme, mide aproximadamente de 12 a 30 µm, incluyendo el flagelo que inicia en la parte posterior del parásito, y emerge libre en el extremo anterior, formando en su trayecto submembranar una membrana ondulante. Presenta un gran núcleo central. El cinetoplasto es grande y de ubicación subterminal. Es capaz de penetrar células como macrófagos, fibroblastos, células del sistema nervioso y muscular (7), Figura 3.

Figura 3. Tripomastigote metacíclico de *Trypanosoma cruzi*



Fuente: Tomado de: *interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of Trypanosoma cruzi, The Causative Agent of Chagas Disease. PLOS. 2012. (6)*

1.2 Modo de transmisión

El parásito *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, puede producir cuadros muy silentes en los pacientes que cursan con infecciones crónicas y cuadros graves en fases agudas que pueden llegar a ser mortales si no se administra tratamiento oportuno.

El parásito tiene diferentes formas de transmisión:

- La transmisión vectorial es la más frecuente y constituye el principal mecanismo de transmisión en América Latina. La Enfermedad de Chagas es transmitida a las personas y a más de 150 especies de animales domésticos y animales salvajes (roedores, marsupiales y armadillos, entre otros) por insectos hematófagos reduvidos de la subfamilia *Triatominae*. Los triatómíneos que se encuentran en grietas y ranuras de viviendas se alimentan de sangre, habitualmente por la noche. Durante la picadura defecan en la piel del hospedero. En las heces del insecto se encuentran los *tripomastigotes metacíclicos*, que penetran por rascado o frotamiento del mismo hospedero, ya sea en el sitio de la picadura o sobre lesiones de continuidad.
- Por transfusión sanguínea cuando se transfunde hemoderivados con el parásito y trasplante de órganos y tejidos cuando estos igualmente están infectados.
- Forma congénita (vertical o congénita), se estima que en Latinoamérica existen unos 2 millones de mujeres en edad fértil, que si llegasen a infectarse serían susceptibles de

transmitir el parásito al feto. También se ha indicado que se infectan al menos 15,000 neonatos cada año en Latinoamérica y 2,000 en Norteamérica. La transmisión se ha acentuado en Europa por la migración de personas infectadas provenientes de varios países endémicos en Latinoamérica (8–10).

- Accidentes de laboratorio.
- Vía oral, un mecanismo emergente, a través de ingesta de los triatomíneos; ingesta de alimentos contaminados con heces de los artrópodos o con secreciones de reservorios (11).

La enfermedad de Chagas tiene dos fases claramente diferenciadas:

La fase aguda que dura aproximadamente 60 días post infección, en la mayoría de los casos no hay síntomas, puede haber fiebre, dolor de cabeza, agrandamiento de ganglios linfáticos, palidez, dolores musculares, dificultad respiratoria, dolor abdominal o torácico, edema facial generalizado, presentar una lesión cutánea conocida como chagoma o un edema bipalpebral unilateral llamado signo de Romaña (2,13).

Durante la fase crónica, los parásitos permanecen ocultos principalmente en el músculo cardiaco y digestivo. El 60-70% de los pacientes crónicos son asintomáticos (forma indeterminada), mientras que el 30-40% tiene o van a desarrollar en algún momento de su vida cardiomiopatía, megasíndromes digestivos o ambas (14). En Colombia la cepa de *Trypanosoma cruzi* predominante es la TcI, la cual se ha visto asociada principalmente con cardiomegalia (4,5).

1.3 Prevención

La Enfermedad de Chagas no es una patología erradicable; corresponde a una zoonosis con un gran número de reservorios animales que hace imposible la eliminación de las fuentes de infección.

El control de la transmisión por *T.cruzi* en países endémicos como Colombia, depende principalmente del control vectorial como la disminución de la población domiciliaria del vector a través de iniciativas como el plan de certificación de la interrupción de la transmisión de *Rhodnius prolixus* como el principal vector domiciliado que involucra actividades de fumigación residual y mejora de las viviendas, asimismo depende también de la prevención de la transmisión mediante mecanismos no vectoriales, el control transfusional de donantes de sangre y el control de trasplante de órganos. De la misma forma, dentro de los principios para el control de la Enfermedad de Chagas se encuentra la profilaxis personal con el uso de medidas como mosquiteros y a nivel comunitario la reorganización al interior de las viviendas (12).

El control de vectores y el control transfusional de la transmisión de *T. cruzi* ha sido exitoso en varios países endémicos, pero otros mecanismos de transmisión, como la oral, la congénita, accidental y el trasplante de órganos pueden mantener la infección.

2. DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO

2.1 Bioseguridad

Las muestras que requieren ser remitidas al LNR, deberán ser enviadas cumpliendo con todas las medidas de bioseguridad y deben obedecer a lo establecido por normas nacionales e internacionales.

2.2 Toma de muestras

Las muestras pueden ser recolectadas por un profesional de la salud como enfermería, medicina o bacteriología entrenadas en la recolección de muestras y durante la recolección, manipulación y transporte de las muestras se deben tener presentes las medidas de bioseguridad y la utilización de los elementos de protección individual como tapabocas, protección ocular, guantes y bata desechable.

Para garantizar la trazabilidad de las muestras y la identificación de las mismas, debe hacerse en letra legible y rótulos indelebles con información como nombre completo, apellidos, fecha y hora de toma de la muestra. Las muestras se enviarán al Grupo de Parasitología del INS lo antes posible siguiendo las recomendaciones establecidas en el manual para obtención y envío de muestras para análisis de eventos de interés en Salud Pública <http://www.ins.gov.co/tramites-y-servicios/examenes-de-inter%C3%A9s-en-salud-publica/SiteAssets/Manual%20obtencion%20y%20envio%20de%20muestras%20de%20EISP.pdf>

2.3 Tipo de muestra, conservación, almacenamiento y transporte

En las tablas 1, 2 y 3 se describen el tipo de muestra, el momento de recolección, condiciones, ensayo recomendado y las condiciones para el transporte de las muestras.

Tabla 1. Muestras para ensayos parasitológicos directos

Tipo de muestra, conservación y transporte	Momento de toma de la muestra según fase de Enfermedad	Técnica a realizar
Sangre capilar obtenida por punción digital para FSP y GG, transportar las láminas a temperatura ambiente protegidas de su posible ruptura.	Fase aguda	Frotis de Sangre Periférica (FSP) Gota Gruesa (GG) Coloreados con colorantes derivados de Romanowsky o el mismo Romanowsky modificado.
Sangre total obtenida por venopunción en tubos con EDTA (5 mL), transportar a 4 a 8 °C con refrigerantes <i>Nota:</i> la viabilidad de los tripomastigotes puede depender de la parasitemia y puede ser evidente en un periodo no mayor a 6 horas	Fase aguda	Frotis de Sangre Periférica (FSP) Gota Gruesa (GG). Coloreados con colorantes derivados de Romanowsky o el mismo Romanowsky modificado. Microhematocrito Micrométodo

Tabla 2. Muestras para ensayos parasitológicos indirectos

Tipo de muestra, conservación y transporte y cantidad en volumen	Momento de toma de muestra según fase de la Enfermedad	Técnica a realizar
Ensayos moleculares: Sangre total en EDTA, volumen a volumen en clorhidrato de Guanidina 6M. <i>Indicación:</i> Inmediatamente después de la toma de sangre con anticoagulante EDTA (5 mL debe agregársele 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.	qPCR Multiplex para detección de ADN de <i>T.cruzi</i>
Sangre total obtenida por venopunción en tubos con Citrato de sodio al 3,8% (4 mL), transportar a temperatura ambiente sin refrigerantes	Fase aguda	Hemocultivo

Tabla 3. Muestras para ensayos de Inmunodiagnóstico

Tipo de muestra, conservación y transporte y cantidad en volumen	Momento de la toma de la muestra según fase de la Enfermedad	Técnica a realizar	Condiciones
Suero, obtenido por Venopunción en tubos sin anticoagulantes (5 mL), transportar a 4 a 8°C con refrigerantes y en viales de polipropileno herméticamente cerrados. Remitir como mínimo un volumen de 500 uL Algunas técnicas de inmunodiagnóstico permiten el uso de plasma, en caso tal, obtener sangre total en tubos con anticoagulante (5 mL) y transportar a 4 - 8°C con refrigerantes.	Cualquier momento ante sospecha de fase crónica. Y ante la sospecha de una fase aguda (tomar una primera muestra mínimo a partir del día 25 post infección y una segunda muestra después de 21 a 25 días de haber tomado la primera)	Inmunoensayo enzimático (EIA) o Ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) Quimioluminiscencia (ChLIA) Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) Hemaglutinación Indirecta (HAI) Western Blot (WB) e Inmunoblot	La muestra debe estar libre de hemolisis

Para el análisis patológico de la enfermedad de Chagas aguda, se debe enviar una muestra representativa del corazón de ambos ventrículos, aurículas, que incluya epicardio, miocardio y endocardio. La confirmación se basa en la identificación morfológica de amastigotes de tripanosoma intracardiacos a manera de pseuquistes, severa miocarditis linfocitaria y monocitaria con PMN neutrófilos, eosinófilos y exuberante pérdida/ruptura de las miofibrillas. Es necesaria la correlación con las pruebas parasitológicas/serológicas específicas particularmente en ausencia morfológica de amastigotes en muestra cardiaca post mortem.

2.4 Documentación requerida

Las muestras remitidas al Grupo de Parasitología del Laboratorio Nacional de Referencia, deberán enviarse acompañadas 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 y síntomas clínicos
- Exámenes paraclínicos adicionales realizados.

2.5 Métodos de laboratorio empleados para el diagnóstico del agente etiológico

2.5.1 Ensayos para fase aguda

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

- Examen directo de sangre fresca
- Gota gruesa
- Frotis o extendido de sangre periférica
- Métodos de concentración como el micrométodo, el microhematocrito y el método de Strout

El parásito puede estar en circulación principalmente durante los primeros 30 días y hasta los 60 e inclusive 90 días, considerada ya como una fase aguda tardía donde la parasitemia va disminuyendo y es menor que la fase inicial, razón por la cual es recomendable realizar todas las técnicas parasitológicas, especialmente los métodos que concentran los parásitos, así mismo es importante tener presente realizar todos de manera seriada varias veces al día por al menos durante una semana(15,16).

La fase aguda también puede ser diagnosticada mediante métodos parasitológicos indirectos:

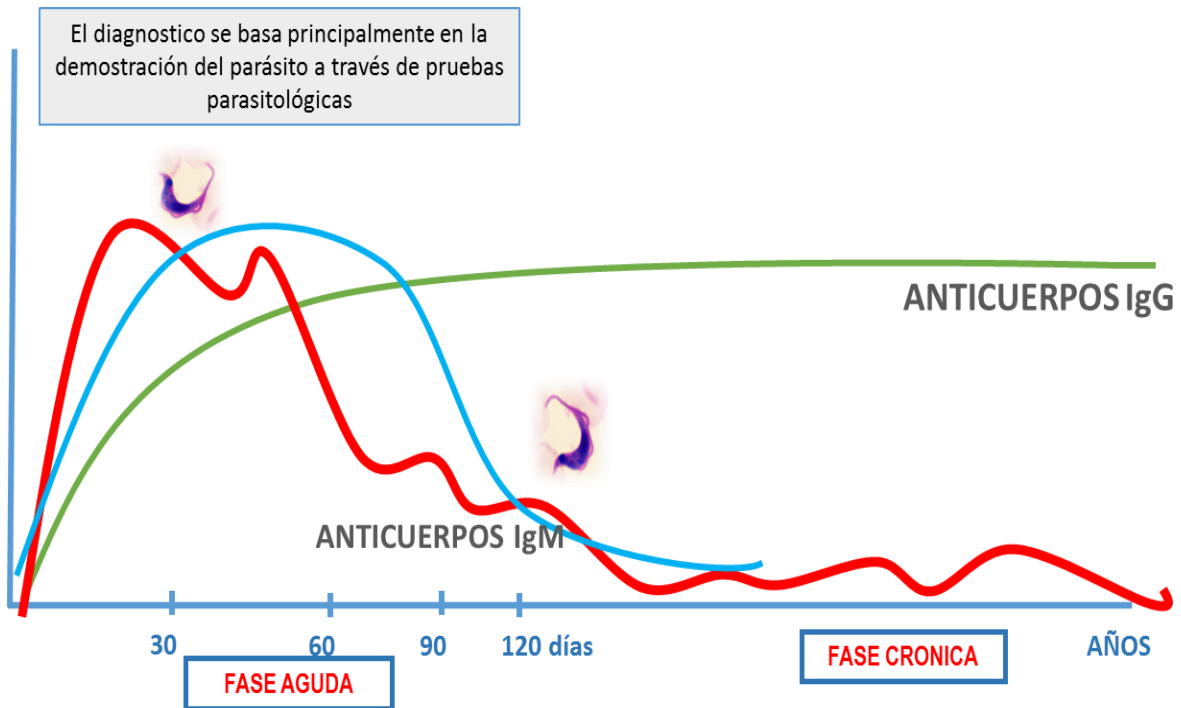
- Hemocultivo
- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
- Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

Estos métodos son especializados para laboratorios de referencia pero constituyen una herramienta más para establecer su diagnóstico. El desarrollo de métodos serológicos en busca de anticuerpos anti *T. cruzi* durante esta fase también tiene una utilidad complementaria, teniendo en cuenta que al final del primer mes hay anticuerpos Ig G detectables (17–20).

En pacientes con infección por VIH, inmunosuprimidos o inmunodeprimidos por cualquier causa, la reactivación de la enfermedad de Chagas crónica ha sido descrita en países endémicos y no endémicos, es considerada como una reagudización de la infección por *T. cruzi* con presencia de parásitos en sangre o fluidos infectados, los cuales pueden ser detectados por métodos

parasitológicos. La reactivación ocurre en aproximadamente un 30% de los pacientes co- infectados con *T. cruzi* y VIH (21), Figura 4.

Figura 4. Fundamento parasitológico y serológico del diagnóstico de la Enfermedad de Chagas



Fuente: Elaborado por autores. Grupo de Parasitología. LNR

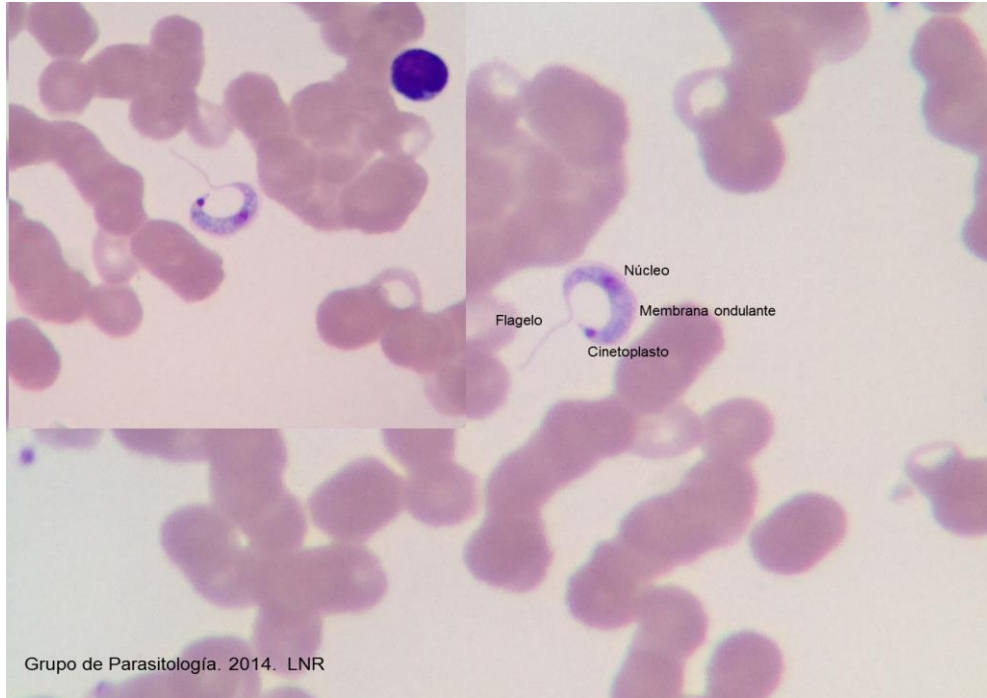
2.5.1.1 Examen directo de sangre fresca

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 serpenteante de los tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

2.5.1.2 Frotis o extendido a partir de sangre fresca

Se obtiene 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 5.

Figura 5. Tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* en frotis o extendido de sangre periférica con coloración de Field

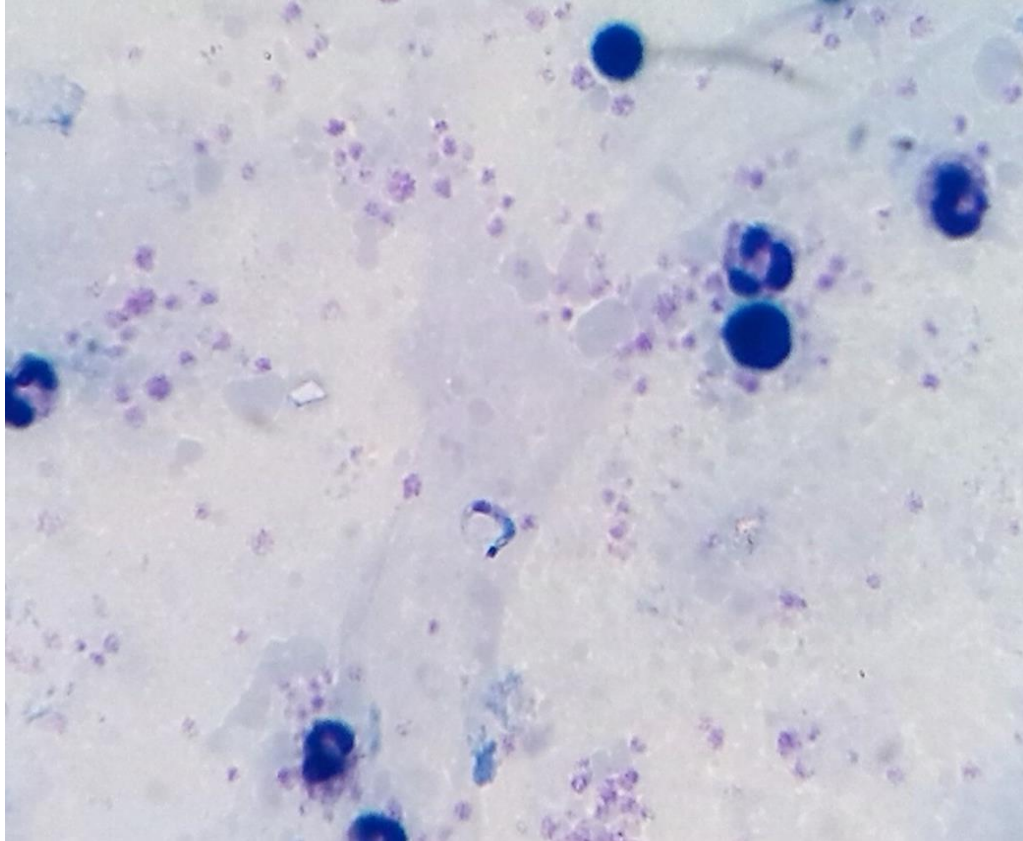


Fuente: Grupo de Parasitología. LNR

2.5.1.3 Gota gruesa a partir de sangre fresca

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). Tiene la ventaja que existe experiencia en su elaboración y coloración, gracias a que es el principal método de diagnóstico de malaria, por lo cual existen en todo el país profesionales y personal técnico entrenado para esta técnica. 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 perderse, Figura 6.

Figura 6. Tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* en gota gruesa con coloración de Field

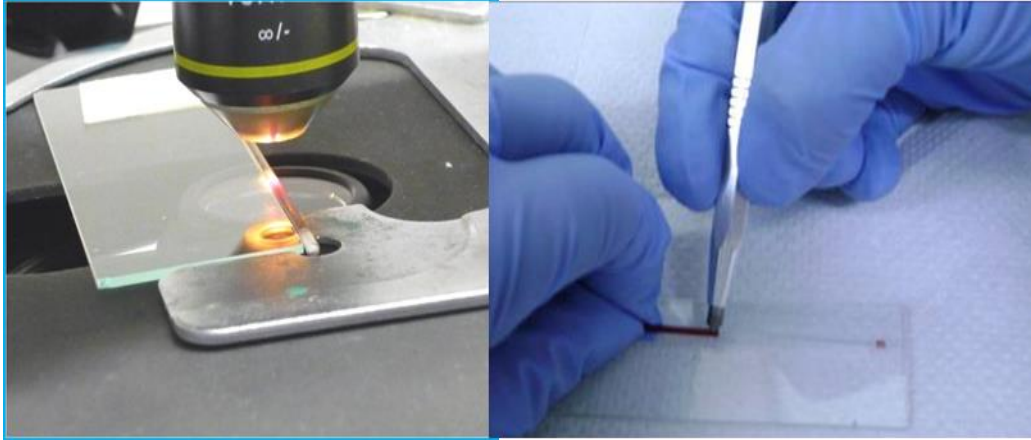


Fuente: Grupo de Parasitología. LNR

2.5.1.4 Microhematocrito

Corresponde a una técnica de microconcentración 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 microcentrífuga (5-8 min). Los tripanosomas se ubicarán entre los glóbulos blancos y el plasma y se podrán observar en esta interface 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 en la interface 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, retirar la laminilla, dejar secar, fijar con metanol y colorear con derivados de Romanowsky, Figura 7.

Figura 7. Procedimiento de visualización y ruptura del microhematocrito

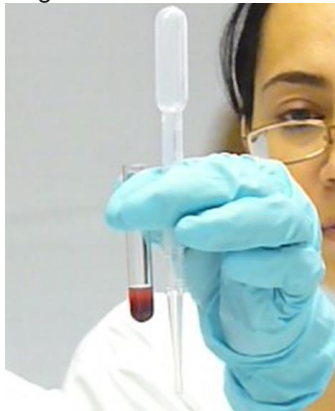


Fuente: Grupo de Parasitología, LNR.

2.5.1.5 Método de Strout

Se obtienen de 5 a 10 mL de sangre venosa sin anticoagulante. Es una de las técnicas más sensibles, pues utiliza el mayor volumen de sangre y permite concentrar los parásitos. Tomar la muestra y dejar retraer el coágulo a temperatura ambiente por 15-20 min, posteriormente, retirar el coágulo del tubo con ayuda de un escobillón sin algodón o extraer el suero en un nuevo tubo. Centrifugar el suero obtenido a baja velocidad (600-800 rpm) por 1 minuto para eliminar los glóbulos rojos, separar el sobrenadante y centrifugar nuevamente a una mayor velocidad (2500 a 3000 rpm) por 3-5 minutos para concentrar los parásitos en el sedimento. A partir del sedimento se hace un montaje en fresco y observación con objetivo de 10x y 40x y adicionalmente realizar un set de frotis para tinciones con colorantes derivados de Romanowsky. Figura 8.

Figura 8. Método de Strout



Fuente: Grupo de Parasitología. LNR.

2.5.1.6 Micrométodo

Tomar 50 µL de heparina y 500 µL de sangre total venosa en un vial eppendorf, mezclar por inversión, centrifugar 1 minuto a 3000 r.p.m. Tomar una gota de la interfase, que corresponde a la capa leucoplaquetaria y depositarla en una lámina portaobjeto, cubrir con una laminilla cubreobjetos, dejar en reposo durante 5 minutos y observar con objetivo de 10x y 40x. Se recomienda realizar una observación de la totalidad del diámetro de la laminilla.

2.5.1.7 Diagnóstico molecular de *T. cruzi*

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* y del inserto de *A. thaliana* en el plásmido IAC (22).

Para realizar el diagnóstico por laboratorio de la enfermedad de Chagas se deben tener presente tres componentes fundamentales: el epidemiológico, el clínico y el componente de laboratorio. El epidemiológico que contribuye a orientar el diagnóstico especialmente en zonas endémicas con transmisión activa, el componente clínico útil ante la sospecha de una fase aguda y el componente de laboratorio que define o descarta una infección por parte del parásito *Trypanosoma cruzi* mediante pruebas parasitológicas y/o serológicas, o ambas (3,15).

2.5.1.8 Lineamientos para el diagnóstico por laboratorio en fase aguda

Un resultado POSITIVO en un método parasitológico directo confirma la infección, pero un resultado NEGATIVO no asegura que el paciente no tenga la infección, razón por la cual los métodos parasitológicos directos se deben realizar todos de manera seriada varias veces al día por al menos durante una semana, simultáneamente se deben realizar los métodos serológicos y de manera adicional los métodos parasitológicos indirectos. El médico realizará la correlación de estos resultados con la clínica y el nexa epidemiológico.

En la fase aguda ante la presencia de síntomas por más de 30 días, la probabilidad de hallar el parásito en sangre va disminuyendo y depende del número de veces que se realicen los métodos de diagnóstico parasitológico directo, del número de muestras analizadas por día y de la toma de estas durante los picos febriles. Durante esta fase los métodos parasitológicos de concentración (micrométodo, microhematocrito y método de Strout) deberán ser los métodos de elección (14,23).

2.5.2 Ensayos para fase crónica

En la fase crónica la parasitemia disminuye a tal punto que no se encuentran parásitos circulantes por largos periodos y las técnicas de multiplicación parasitaria como el hemocultivo o xenodiagnóstico o las moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa convencional (PCR) y en tiempo real (qPCR) pueden resultar negativas, por lo tanto su diagnóstico se debe realizar de manera indirecta mediante detección de anticuerpos específicos anti Ig G – *T. cruzi*, teniendo en cuenta que el parásito es reconocidamente muy antigénico y en la mayoría de los individuos inmunocompetentes se presenta una fuerte respuesta inmune que permite la búsqueda de

anticuerpos contra el mismo, los que se encuentran presentes en prácticamente todos los infectados (3).

Por lineamiento de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el diagnóstico se realiza mediante dos serologías de diferente principio y uso de antígenos diferentes (16). Sin embargo, a pesar que la composición de los antígenos utilizados en las técnicas serológicas es muy variable, ninguno alcanza por si solo el 100% de efectividad en el diagnóstico y esta es la razón por la cual la OMS recomienda realizar dos técnicas para confirmar o descartar el diagnóstico con un rango de sensibilidad que puede variar entre el 98 y 99,5% (20).

Actualmente el algoritmo de diagnóstico serológico fue replanteado mediante un estudio de validación secundaria realizado en el Laboratorio Nacional de Referencia de Parasitología del Instituto Nacional de Salud, en el cual se verificó el rendimiento diagnóstico de 6 técnicas de ELISA y 1 Quimioluminiscencia (ChLIA).

El desempeño de las pruebas de ELISA antígenos totales reportó una proporción de sensibilidad de 99,22% (IC95% 97,94% - 100%) y las pruebas de ELISA y ChLIA con principio antigénico de péptidos sintéticos y recombinantes reportaron en el mismo estudio proporciones de sensibilidad en un rango de 92,58% - 99,61% y al ser utilizadas, de acuerdo a la recomendación de la OMS sobre uso de dos pruebas en serie, de diferente principio y diversos tipos de antígeno (antígenos totales, péptidos sintéticos o recombinantes) demostraron características de desempeño con una alta especificidad.

Estos estudios concluyen que las pruebas serológicas de ELISA son una buena herramienta para el diagnóstico confirmatorio de la Enfermedad de Chagas en fase crónica si son utilizadas en serie. De acuerdo a lineamientos específicos emitidos por INS se tendrán en consideración el uso de pruebas en paralelo solo en algunos escenarios.

Por lo anterior, se recomienda que la primera prueba (ELISA antígenos totales/crudos) a utilizar en el algoritmo, muestre una alta sensibilidad $\geq 98\%$ y como prueba complementaria para confirmar el diagnóstico serológico, se recomienda el uso de pruebas de ELISA o ChLIA con antígenos recombinantes o péptidos sintéticos con una especificidad $\geq 98\%$.

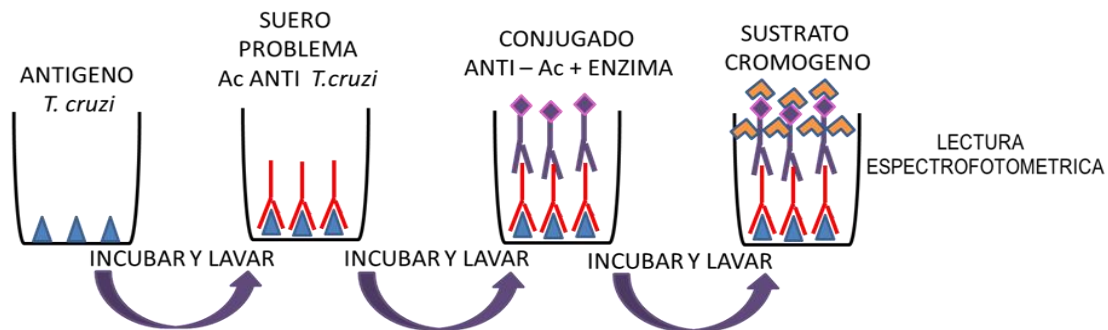
No están indicados los métodos parasitológicos directos e indirectos debido a su baja sensibilidad durante la fase crónica (excepto en casos de reactivación por inmunosupresión). Si bien los pacientes en fase crónica podrían tener parasitemia circulante, generalmente estos métodos poseen bajo valor de sensibilidad (22).

2.5.2.1 Ensayos de inmunodiagnóstico

2.5.2.1.1 ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay / Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzima) o EIA (Enzyme Immunoassay / Enzimo inmunoensayo)

Métodos inmunoenzimáticos en los cuales se pueden utilizar antígenos purificados, recombinantes, péptidos sintéticos o totales a partir de cepas de *Trypanosoma cruzi* de diferentes DTU dependiendo de la casa comercial, los cuales reaccionan con muestras de suero que tengan presentes anticuerpos específicos para *T. cruzi* y forman complejos estables. Se realiza un lavado para eliminar el material no unido y se añade un conjugado Ig G anti-humano marcado con una enzima que puede ser peroxidasa o fosfatasa alcalina. Si el complejo antígeno/anticuerpo está presente, el conjugado se unirá a este complejo. Luego de un segundo lavado, se añade una solución de sustrato de enzima que contiene un cromógeno, solución que desarrollará un color, si la muestra es positiva. La reacción se detiene o se bloquea con ácido sulfúrico o hidróxido de Sodio. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de anticuerpos anti-*T. cruzi* en la muestra (24). El principio del ensayo se describe en la figura 9.

Figura 9. Técnica de Elisa para determinación de Ac Ig G anti *T. cruzi*



Fuente: Elaborado por autores. Grupo de Parasitología. LNR. 2014

2.5.2.1.2 Quimioluminiscencia (ChLIA)

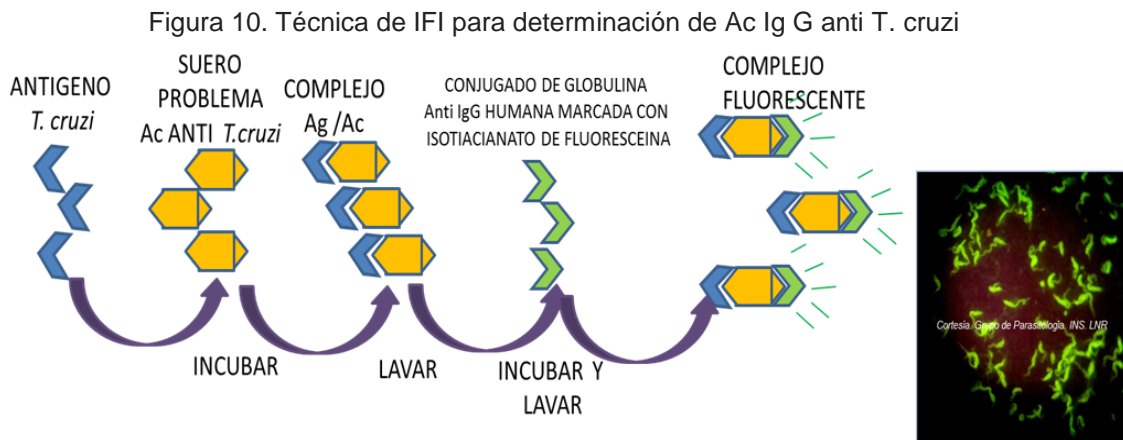
Corresponde a una técnica de dos pasos:

- Un primer paso en el que las micropartículas recubiertas con antígenos recombinantes de *T. cruzi* (FP3, FP6, FP10 y TcF) se incuban con la muestra (plasma, suero, calibrador o control) y diluyente de la muestra en los pocillos de la bandeja de reacción. Durante la incubación, los anticuerpos contra *T. cruzi* presentes en la muestra se unen al (los) antígeno (s) en las micropartículas.
- En un segundo paso, después de la incubación, la mezcla de reacción se transfiere a la matriz de fibra de vidrio de la bandeja de reacción, usando el lavado de transferencia. Las micropartículas son capturadas por la matriz mientras que la mezcla restante fluye a través del papel secante absorbente. El conjugado anti-CPSP-acridinio de ratón se añade a las micropartículas de la matriz y se incuba para unir cualquier anticuerpo de *T. cruzi* que esté

presente. La señal quimioluminiscente se genera mediante la adición de una solución alcalina de peróxido de hidrógeno. Los fotones resultantes se cuentan y la cantidad de luz emitida es proporcional a la cantidad de anticuerpo a *T. cruzi* en la muestra. La presencia o ausencia de anticuerpos contra *T. cruzi* en la muestra se determina comparando el número de fotones emitidos a partir de la muestra con un valor de un punto de corte determinado a partir de una calibración realizada en el mismo lote. Si el número de fotones emitidos de una muestra es inferior al valor del punto de corte, la muestra se considera No reactiva para anticuerpos anti *T. cruzi* y si es mayor o igual, la muestra se considera Reactiva

2.5.2.1.3 Inmunofluorescencia Indirecta o IFI

En esta técnica el anticuerpo específico anti *T. cruzi* presente en la muestra de suero reconoce y se une al antígeno (epimastigotes de *T. cruzi* cepas DTU TcI colombianas, el cual se encuentra previamente fijado a las láminas) formando un complejo antígeno/anticuerpo al que se le adiciona el conjugado que corresponde a una gammaglobulina anti Ig G humana marcada con fluoresceína, que reconoce al anticuerpo y se une a él formando un complejo fluorescente, el cual es detectado mediante microscopía de fluorescencia UV (25). El principio del ensayo se resume en la Figura 10.



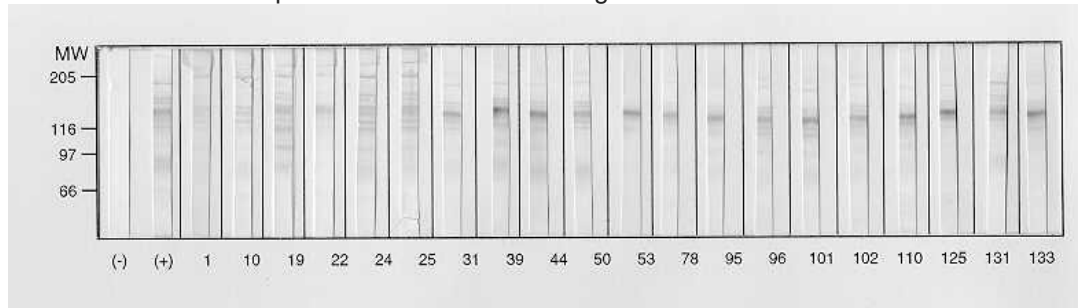
2.5.2.1.4 Hemaglutinación indirecta o HAI

Es una técnica que se basa en la detección de anticuerpos aglutinantes específicos anti *T. cruzi* mediante una reacción de aglutinación de glóbulos rojos sensibilizados en su superficie con fracciones antigénicas solubles del parásito *T. cruzi*. Algunos anticuerpos inespecíficos llamados heterófilos pueden dar lugar a falsos positivos en esta reacción, los cuales pueden ser bloqueados mediante el uso de 2 mercaptoetanol (2 ME).

2.5.2.1.5 Western Blot / Western blot /Inmunoblot o WB

Es una técnica utilizada para la detección y caracterización de proteínas que se basa en la especificidad de reconocimiento entre antígeno y anticuerpo. Implica la separación basada en pesos moleculares de las proteínas de una mezcla compleja a través de una electroforesis en geles de poliacrilamida y una transferencia cuantitativa e irreversible a una membrana. Los antígenos que se han transferido son reconocidos por anticuerpos específicos y son detectados mediante actividad enzimática cromógena (Tesablot), quimioluminiscencia o fluorescencia, Figura 11.

Figura 11. Técnica de WB para determinación de Ac Ig G anti T. cruzi



Fuente: Tomado de Umezawa ES et al, J Clin Microbiol 34: 2143-2147, 1996 (26)

2.5.2.1.6 Pruebas de Diagnóstico Rápido (PDR)

En cuanto al uso de Pruebas de Diagnóstico Rápido (PDR), actualmente en el país se comercializan algunas de ellas bajo registro INVIMA, sin embargo, el LNR de Parasitología participó en un estudio multicéntrico junto a 10 LNR de otros países considerados endémicos y no endémicos, en el cual se evaluaron el desempeño de 11 PDR encontrando que la sensibilidad y especificidad fueron inferiores a las reportadas en estudios previos o a las reportados por los mismos fabricantes. Aunque fue un estudio bajo condiciones de laboratorio controladas, es necesario hacer estudios adicionales de campo y tener en cuenta que aunque algunas de estas pruebas presentaron valor de kappa en un rango casi perfecto con valores de sensibilidad y especificidad por encima de 90%, la recomendación sigue siendo caracterizar el diagnóstico serológico mediante dos pruebas de principio diferente y tener en cuenta que el uso de estas pruebas rápidas es muy limitado (22). Su uso será recomendado solo cuando se cuente con una validación secundaria completa.

2.5.3 Interpretación de resultados

Un resultado positivo del diagnóstico parasitológico en la fase aguda de un paciente que se haya infectado por transmisión vectorial, oral, congénita o por reactivación en pacientes inmunosuprimidos, es la confirmación de la infección por T. cruzi. Sin embargo, un resultado negativo de este diagnóstico parasitológico no indica precisamente su ausencia.

En cuanto a un resultado Reactivo a partir de un diagnóstico serológico, éste con toda certeza es indicativo de la presencia de infección por *T. cruzi*, pero no muestra el estado clínico del paciente.

En la tabla 4 se describe la interpretación de los resultados del diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas de acuerdo al nuevo algoritmo y bajo condiciones controladas de laboratorio:

Tabla 4. Interpretación de resultados de pruebas serológicas

TECNICA	RESULTADO OBTENIDO			
Elisa o EIA de antígenos totales (primera prueba)	Positivo	Negativo	Positivo	Dudoso o Indeterminado
Elisa o EIA o ChLIA de principio diferente a la primera, de péptidos sintéticos o antígenos recombinantes (segunda prueba)	Positivo	Negativo	Negativo, Dudoso o Indeterminada	Positivo
Situación	Confirmado por laboratorio y considerado infectado por <i>T. cruzi</i>	Descartado por laboratorio y considerado no infectado	Discordante Someter la misma muestra a una tercera prueba de diferente principio (IFI o Inmunoblot)	Discordante Someter la misma muestra a una tercera prueba de diferente principio (IFI o Inmunoblot)
IFI o Inmunoblot (tercera prueba)	NA	NA	Positivo	Negativo
Situación			Confirmado por laboratorio y considerado infectado por <i>T. cruzi</i>	Descartado por laboratorio y considerado no infectado

En la técnica de Elisa los valores de absorbancia o densidad óptica pueden llegar a situarse muy cerca del punto de corte sin ser positivo o negativo, zona que es considerada como indeterminada. Esta situación puede presentarse cuando hay un cambio en la historia natural de la infección de un paciente, que puede ser fisiológica o inducida por tratamiento.

En la primera circunstancia, fisiológica, se puede presentar por un lactante nacido de madre infectada, después de 2 a 4 meses de su nacimiento, donde hay transmisión pasiva de anticuerpos maternos (Ig G) sin transmisión del parásito y cuya presencia en sangre puede estar agotándose hasta su desaparición alrededor de los 10 meses. En el segundo caso, de un paciente infectado tratado con medicamento antiparasitario, situación que puede generar concentraciones de anticuerpos que han descendido a tal punto que los resultados de las técnicas pueden demostrar ambigüedad y caer en esta región indeterminada. Esta situación suele denominarse como “camino para la demostración de cura” (1,13).

Así mismo, la técnica de IFI utilizada como tercera prueba, también puede presentar limitaciones y se puede generar un título con fluorescencia muy cerca pero por debajo del valor de referencia e inclusive una fluorescencia desigual en el título considerado como inicio de la positividad, sin ser

considerado positivo debido a su falta de uniformidad. En general se trata de reacciones cruzadas, en particular con leishmaniosis.

Si se presenta esta situación se deberá seguir los siguientes pasos:

Repetir la prueba con la misma muestra.

Si el resultado persiste, remitir la muestra a un laboratorio de mayor complejidad de referencia departamental o nacional.

Si el resultado persiste, solicitar una nueva muestra al paciente, en 25 a 30 días (19).

Para el caso de los donantes, el algoritmo para muestras de donantes reactivos puede ser consultado en el link <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Red-Nacional-Laboratorios/Normatividad%20Red%20nal%20bancos%20de%20sangre/Anexo%20Tecnico%20Nacional%20Circular%20082%20versión%20oficial%202014.pdf>

2.5.4 Forma de reporte de resultados y periodicidad

Los resultados serán comunicados en medio físico mediante impresión directa a partir del Software del INS o mediante correo electrónico al destinatario con la opción de demostración de recepción y lectura del mensaje enviado. La oportunidad en la respuesta es de 6 días hábiles.

2.5.5 Facturación de las pruebas de laboratorio

Mediante Resolución No. 5592 de 2015 del Ministerio de Salud y Protección Social, por la cual se actualiza integralmente el Plan de Beneficios en Salud con cargo a la Unidad de Pago por Capitación-UPC del Sistema General de Seguridad Social en Salud - SGSSS y se dictan otras disposiciones, se incluyeron en el Anexo 3 las pruebas tanto parasitológicas como serológicas para el diagnóstico por Laboratorio de la Enfermedad de Chagas. Lo anterior será ajustado según actos administrativos que se emitan posteriormente, Tablas 5 y 6.

Para las pruebas serológicas de determinación de anticuerpos:

Tabla 5. Códigos CUPS para facturación de pruebas serológicas para Enfermedad de Chagas

CÓDIGO CUPS	PROCEDIMIENTO COMO APARECE EN LA RESOLUCIÓN	SOLICITUD MÉDICA	TÉCNICAS INCLUIDAS SEGÚN RESOLUCIÓN 4678 DE 2015
90.6.1.31	<i>Trypanosoma cruzi</i> anticuerpos IgG semiautomatizado o automatizado	Pruebas serológicas para detección de anticuerpos IgG anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	Las técnicas manuales incluyen: inmunofluorescencia indirecta (IFI), inmunoblot, ELISA (cualquier principio antigénico) y hemaglutinación indirecta. Las técnicas semiautomatizadas incluyen: Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), ELISA (cualquier principio antigénico), quimioluminiscencia (CLIA), InmunoBlot, hemaglutinación indirecta.
90.6.1.32	<i>Trypanosoma cruzi</i> anticuerpos manual		
90.6.1.33	<i>Trypanosoma cruzi</i> anticuerpos IgM semiautomatizado o automatizado		

Para las pruebas parasitológicas en las cuales se realiza la determinación del parásito *T. cruzi*, en caso de sospecha de caso agudo:

Tabla 6. 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
90.1.3.05	Examen directo fresco de cualquier muestra	Examen en fresco para <i>Trypanosoma</i>

Un caso de Chagas agudo se confirma por laboratorio, teniendo en cuenta las siguientes situaciones:

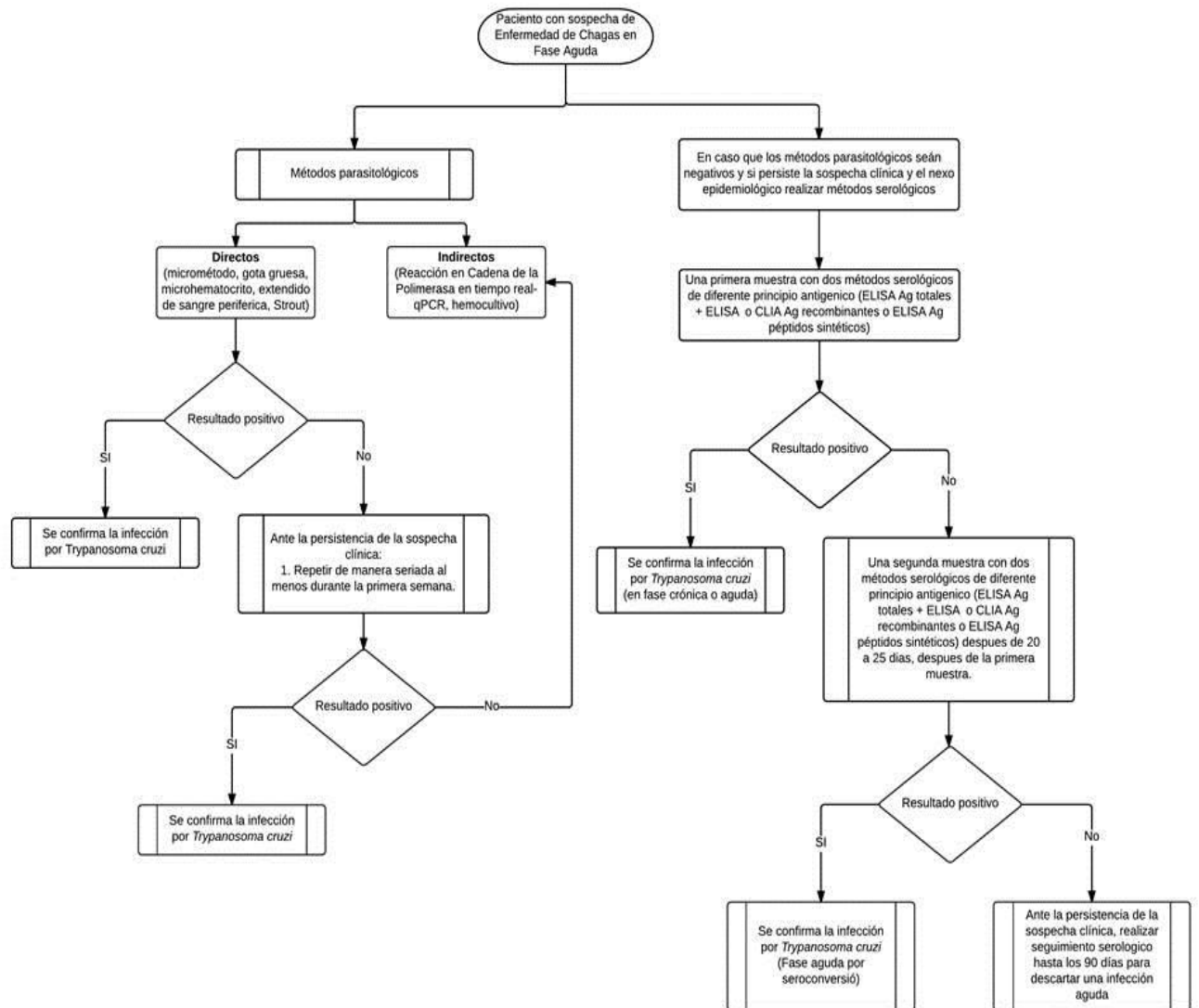
Hallazgo de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* en uno o más de los métodos parasitológicos directos de concentración: *micrométodo, microhematocrito y método de Strout* y en *gota gruesa, examen directo de sangre fresca, frotis o extendido de sangre periférica*, con o sin síntomas

Obtener un resultado positivo en uno de los métodos parasitológicos indirectos (hemocultivo y qPCR), el cual debe ser correlacionado con la sintomatología clínica de Chagas agudo, nexo epidemiológico y de ser posible con pruebas serológicas IgG, teniendo en cuenta que la serología se hace positiva aproximadamente dos semanas pos infección

Cuando no es posible la evidencia parasitológica, una serología positiva mediante dos métodos de principio antigénico diferente, según actual algoritmo, en dos muestras de suero tomadas con intervalo mínimo de tres semanas (21 días) entre una y otra, obteniendo la seroconversión (negativo a positivo), con evidencias clínicas y nexo epidemiológico.

La figura 12, muestra el algoritmo diagnóstico de Chagas agudo.

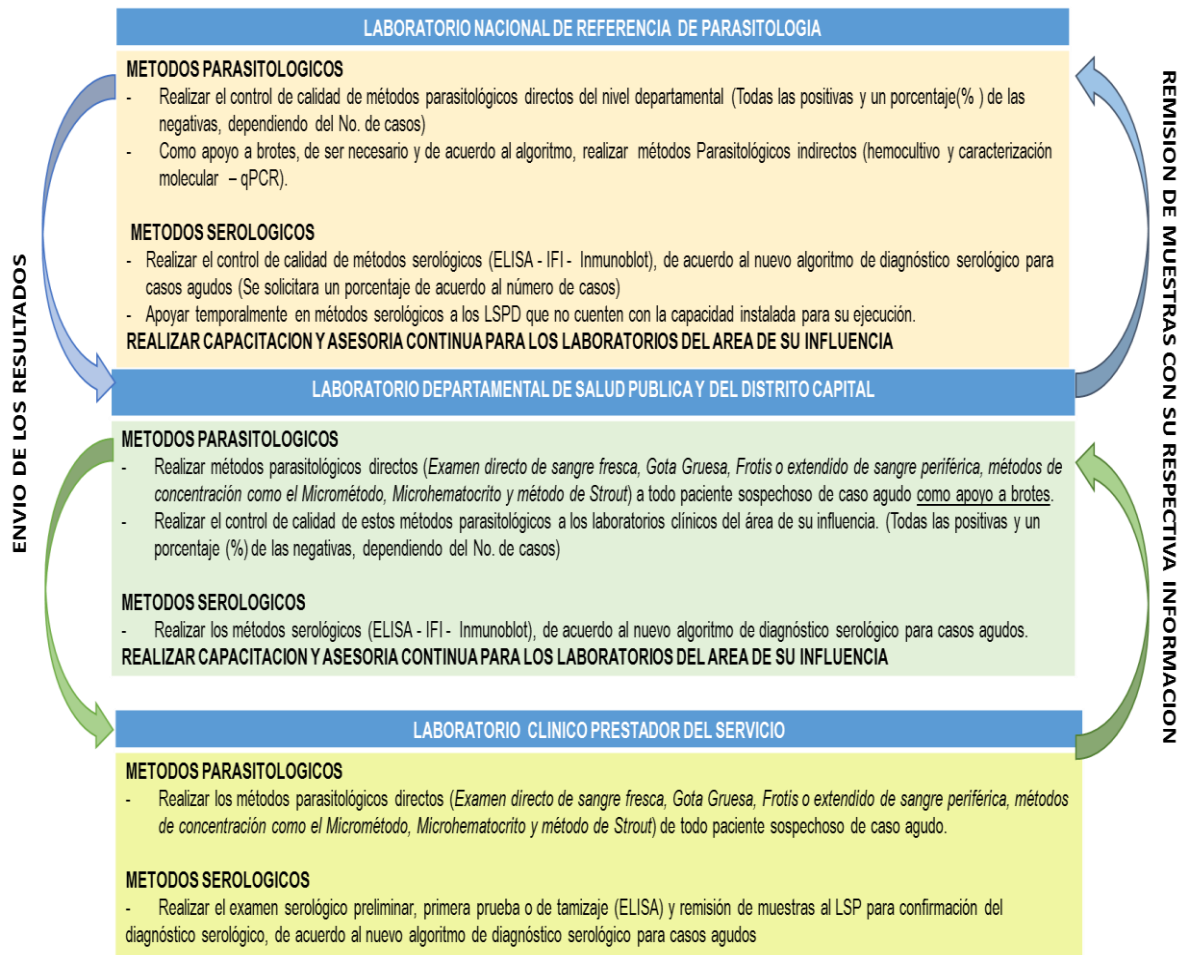
Figura 12. Algoritmo diagnóstico de Chagas agudo



2.5.6 Competencias de los laboratorios en el marco de la Red Nacional de Laboratorios

Teniendo en cuenta el Decreto 2323 de julio de 2006 sobre competencias de los laboratorios en el marco de la Red Nacional de Laboratorios (15), a continuación, se describen las competencias de los laboratorios en el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas en fase aguda en situación de brote desde el nivel nacional hasta el municipal o local, Figura 13.

Figura 13. Competencias de los laboratorios



En cuanto a las competencias relacionadas con el diagnóstico serológico de la fase crónica, se tendrá en cuenta lo descrito en la Ruta de Atención Integral (RIA), la facturación de las pruebas de laboratorio de acuerdo Resolución No. 5592 de 2015 del Ministerio de Salud y Protección Social, por la cual se actualiza integralmente el Plan de Beneficios en Salud con cargo a la Unidad de Pago por Capitación-UPC del Sistema General de Seguridad Social en Salud - SGSSS y la Recomendación Técnica sobre uso de pruebas de ELISA para diagnóstico serológico publicada en:
<http://www.ins.gov.co/tramites-y-servicios/examenes-de-interés-en-salud-publica/Parasitologa/Recomendación%20técnica%20uso%20ELISA%20Chagas.pdf>

En la Figura 14 se muestra el algoritmo diagnóstico de Chagas crónico y en la figura 15 el algoritmo diagnóstico de Chagas congénito.

Figura 14. Algoritmo diagnóstico de Chagas crónico

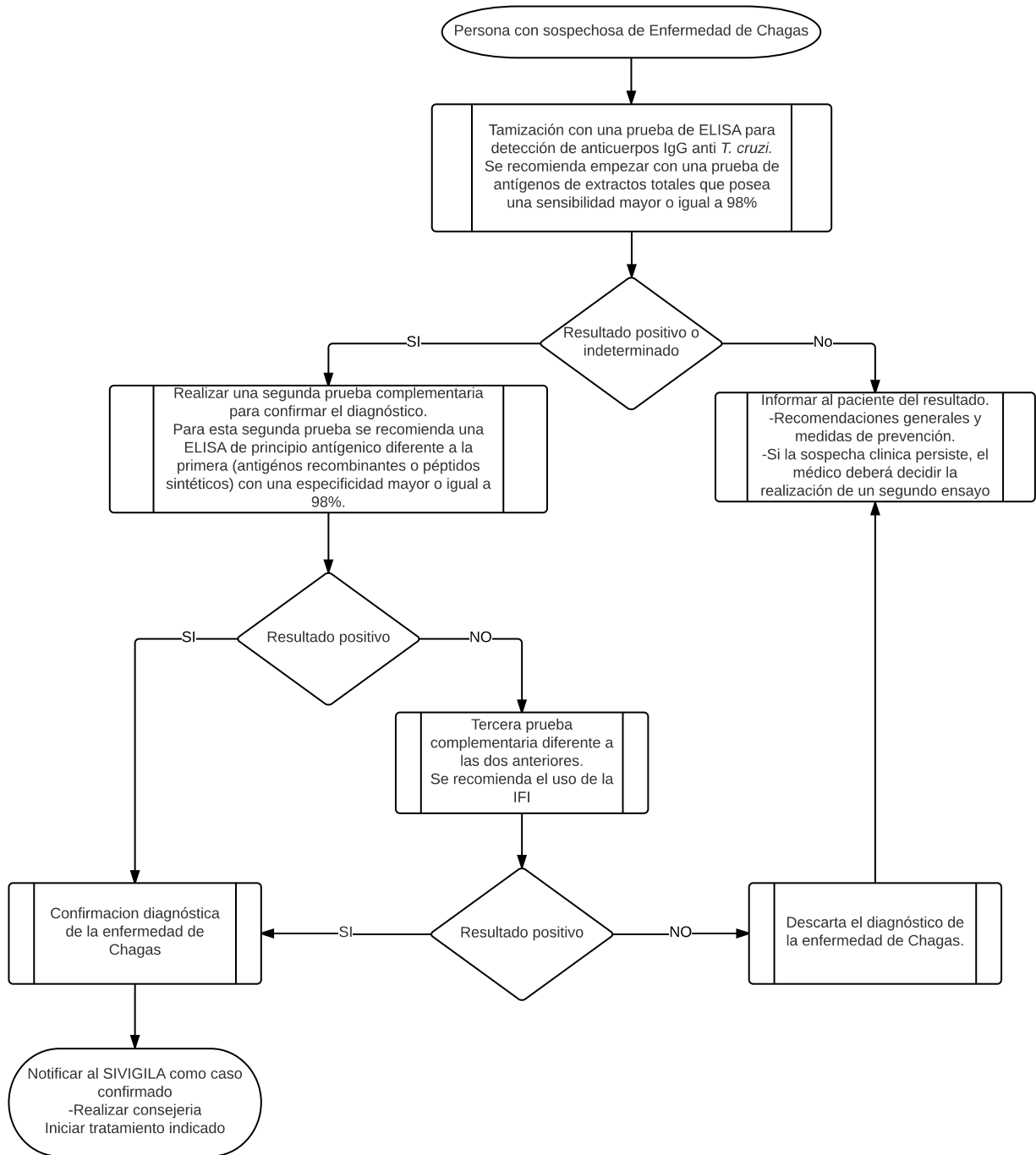
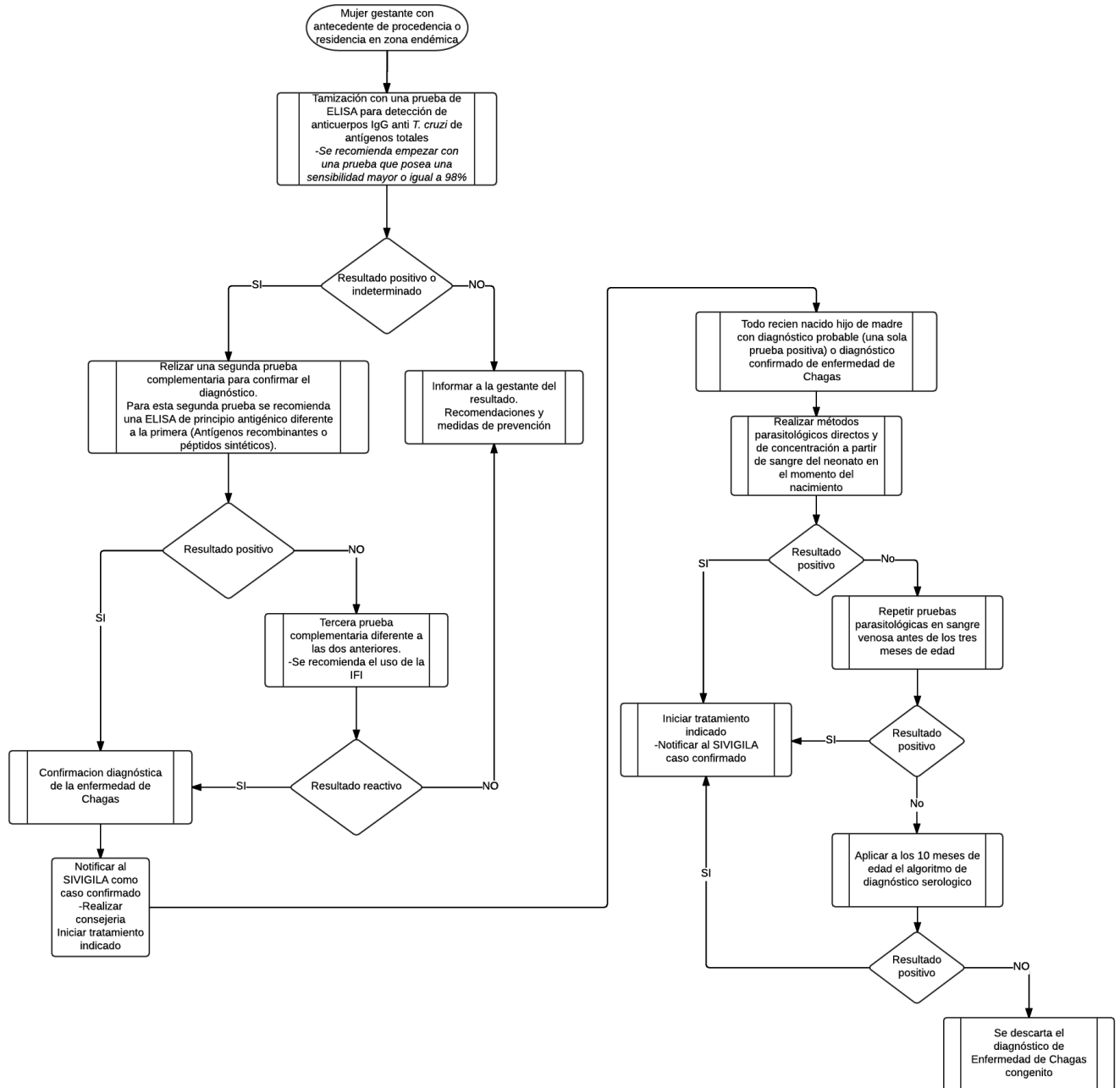


Figura 15. Algoritmo diagnóstico de Chagas congénito



3. CONTROL DE CALIDAD

Con relación al control de calidad, el grupo de parasitología tiene dos modalidades, la primera los controles de calidad en los cuales participa el LNR de Parasitología, entre los cuales está, uno nacional con el Instituto Colombiano de Medicina Tropical (ICMT) evaluando pruebas parasitológicas y serológicas e internacionales con el Hemocentro de Brasil y OPS, ControlLab y LICON de México. La segunda modalidad son los programas que ofrece el LNR a los LDSP del país donde evalúa el desempeño de pruebas parasitológicas y serológicas según la capacidad instalada de cada departamento.

3.1.1 Programa de Evaluación Externa del Desempeño Directa - PEEDD

En cumplimiento del Decreto 2323 de 2006 el PEEDD en el diagnóstico parasitológico del evento de Enfermedad de Chagas se realiza a nivel nacional para los 32 Laboratorios Departamentales de Salud Pública, el Laboratorio de Salud Pública del Distrito capital y todos los laboratorios de la red privada que lo solicitan por demanda.

El PEED en el inmunodiagnóstico se realiza para todos aquellos Laboratorios departamentales que cuentan con la infraestructura para realizar las pruebas serológicas y todos los laboratorios de la red privada que lo solicitan por demanda.

Los PEED son enviados una vez por año, consta de 10 muestras ciegas acompañado por una plantilla de resultados que el laboratorio participante debe diligenciar. Se establece para todos los participantes un rango de tiempo similar para recibir los resultados. Las variables a evaluar son la concordancia mediante índice de kappa, porcentaje de concordancia y z score y se evalúa igualmente la oportunidad en la respuesta.

En el siguiente link encontrara el protocolo del Programa de Evaluación Externa del Desempeño: <http://www.ins.gov.co/tramites-y-servicios/programas-de-calidad/Paginas/introduccion.aspx>

3.1.2 Programa de Evaluación Externa del Desempeño Indirecto - PEEDI

Esta actividad se realiza a los LDSP que se encuentran en el Plan de certificación de la Interrupción de la transmisión de *T. cruzi* por *R. prolixus* bajo un lineamiento establecido por el LNR de Parasitología.

Se dará inicio con esta actividad con los municipios y LSPD que participan en el Proyecto piloto de eliminación de barreras en el marco de la Ruta Integral de Atención en Salud (RIAS) de Enfermedad de Chagas.

4. VIGILANCIA POR LABORATORIO DEL *Trypanosoma cruzi*

La vigilancia del *Trypanosoma cruzi* consiste en identificar y describir su circulación mediante variables relacionadas con sus características genotípicas y los sitios en donde circula con el fin de suministrar información que permita orientar las acciones de prevención.

De igual manera se definirán indicadores que permitirán resumir estos aspectos y realizar su publicación en forma periódica, a través de informes técnicos, así como en la construcción de repositorios institucionales donde fácilmente se puedan obtener los microdatos y permitir su uso por parte de la comunidad científica, médica, académica y administrativa del sistema de salud y el público en general.

5. ESTRUCTURA Y FUNCIONES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS (RNL) PARA EL EVENTO DE ENFERMEDAD DE CHAGAS

De acuerdo al Decreto 2323 de julio de 2006 sobre competencias de los laboratorios en el marco de la Red Nacional de Laboratorios (7), se describen las funciones de los laboratorios en el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas desde el nivel municipal o local hasta el nivel nacional.

5.1 Funciones del Laboratorio Nacional de Referencia (LNR)

LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA DE PARASITOLOGIA - INS

- Recepción de las muestras procedentes de los LSPD.
- Realizar apoyo y control de calidad de pruebas parasitológicas a los LDSP en situaciones de brote y emergencia.
- Realizar apoyo de diagnóstico serológico para las muestras enviadas por parte de los LDSP solo en situaciones especiales de brote y emergencia.
- Realizar semestralmente los Programas de Evaluación Externa del Desempeño en el diagnóstico parasitológico y serológico de la Enfermedad de Chagas a los LSPD.
- Realizar de acuerdo al lineamiento establecido el Programa de Evaluación Externa Indirecta del Desempeño en el diagnóstico serológico para los LSPD en el marco del Plan de certificación de la Interrupción del principal vector domiciliado y en el marco del Proyecto de eliminación de barreras donde se realizará la prueba piloto de la RIA del evento de Chagas.
- Diligenciamiento de bases de datos de diagnóstico del evento.
- Elaborar y publicar manuales de laboratorio, documentos técnicos, guías e informes.
- Apoyar al Ministerio de Salud y Protección Social en la toma de decisiones a nivel nacional.
- Emitir circulares, memorandos y lineamientos dirigidos a las direcciones territoriales de salud y LSPD.
- Realizar asistencias técnicas (presenciales y virtuales)
- Orientar la metodología para realización de planes de contingencia con su respectivo seguimiento.
- Emitir informes de retroalimentación en el control de calidad de las muestras enviadas por parte de los LDSP
- Procesar y analizar la información a nivel nacional para la toma de decisiones y recomendar estrategias para el manejo, control y mitigación del impacto por el evento.
- Realizar control de calidad al diagnóstico serológico en estudios especiales desarrollados por los LDSP.
- Participar en proyectos de investigación en Salud Pública.

5.2 Funciones del laboratorio de Salud Pública (LSP)

LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PUBLICA Y DEL DISTRITO CAPITAL

- En apoyo a la vigilancia del evento en situaciones especiales como emergencias, brotes y como respuesta al diagnóstico de pacientes que deben ser atendidos por Red Pública Territorial, realizar recolección de las muestras para el diagnóstico parasitológico y serológico.
- Enviar muestras de suero al LNR del INS, solo en caso que el laboratorio no pueda dar respuesta al diagnóstico y se trate de situaciones especiales, de emergencia o brote.
- Diligenciar toda la documentación necesaria para enviar las muestras.
- Recepción de los resultados de los diagnósticos de las muestras remitidas al LNR del INS.
- Realizar la remisión correspondiente para el tratamiento y manejo clínico del paciente.
- Participar semestralmente en los Programas de Evaluación Externa del Desempeño en pruebas parasitológicas directas e inmunodiagnóstico de la Enfermedad de Chagas.
- Participar, de acuerdo al cronograma establecido en el lineamiento en el Programa de Evaluación Externa Indirecta del Desempeño en el diagnóstico serológico para los LSPD en el marco del Plan de certificación de la Interrupción del principal vector domiciliado y en el marco del Proyecto de eliminación de barreras donde se realizará la prueba piloto de la RIA del evento de Chagas.
- Realizar Evaluación Externa del Desempeño en el diagnóstico parasitológico y serológico a su red interna de laboratorios o laboratorios del área de su influencia.
- Realizar control de calidad y pruebas complementarias serológicas a los laboratorios municipales en el desarrollo de estudios especiales y remitir las muestras que sean requeridas de una confirmación adicional al LNR de Parasitología del INS.

5.3 Funciones del laboratorio público y privado o referente para el evento en el nivel municipal y/o local según corresponda

LABORATORIO CLINICO

- Recolección de las muestras para el diagnóstico parasitológico y serológico de la Enfermedad de Chagas.
- Realizar pruebas parasitológicas y serológicas, de acuerdo a la capacidad diagnóstica.
- Enviar muestras de suero a un laboratorio de mayor complejidad, en caso que el laboratorio no pueda dar respuesta al diagnóstico, Laboratorio de Salud Publica Departamental (LDSP) o al LNR, teniendo en cuenta que exista una situación de emergencia, brote o si son pacientes que deben ser atendidos por Red Pública Territorial.
- Diligenciar toda la documentación necesaria para enviar las muestras.
- Recepción de los resultados del laboratorio y retroalimentación a los pacientes solicitantes o medico tratante
- Participar en los Programas de Evaluación Externa del Desempeño del evento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Telleria J, Tibayrenc M. American Trypanosomiasis Chagas disease. One Hundred Years of Research [Internet]. First Edit. Elsevier. USA; 2010. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24369927>
2. Bern C, Longo DL. Chagas' Disease. N Engl J Med [Internet]. 2015;373(5):456–66. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra1410150>
3. Brener Z, Andrade ZA, Barral-Netto M. Trypanosoma cruzi e doença de Chagas. Second. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan SA;
4. Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104(7):1051–4.
5. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, et al. The revised Trypanosoma cruzi subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. Infect Genet Evol [Internet]. 2012;12(2):240–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>
6. Teixeira DE, Benchimol M, Crepaldi PH, de Souza W. Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of Trypanosoma cruzi, the Causative Agent of Chagas Disease. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(8):1–13.
7. Uribarren Berrueta T. Enfermedad de Chagas [Internet]. Universidad Nacional Autonoma de Mexico. [cited 2016 May 28]. Available from: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/trypanosomosis.html>
8. Guhl F. Reporte sobre la Enfermedad de Chagas. TDR/SWG/09. Buenos Aires; 2005.
9. Jasso Gutiérrez L. Infecciones congénitas de baja frecuencia en los neonatos. Algunos aspectos relevantes. Bol Med Hosp Infant Mex [Internet]. 2011 [cited 2017 Jun 28];68(1):7–20. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-11462011000100002&lng=pt&nrm=iso
10. Fumadó V, Juncosa T, Posada E, Fisa R, Gállego M, Gascón J. Chagas pediátrico en zona no endémica. Enfermedades Infecc y Microbiol Clínica [Internet]. 2014 May [cited 2017 Jun 28];32(5):293–6. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0213005X13001626>
11. Rueda K, Trujillo JE, Carranza JC, Vallejo GA. Transmisión oral de Trypanosoma cruzi: un nuevo escenario epidemiológico de la enfermedad de Chagas en Colombia y otros países suramericanos. Biomédica. 2014;34(4):631–41.
12. Iborra Bendicho MA. Enfermedad de Chagas en Fase Crónica. Evaluación de diferentes métodos diagnósticos en una zona no endémica. Universidad de Murcia; 2013.
13. Rassi Jr A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. Lancet [Internet]. 2010;375(9723):1388–402. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)
14. WHO. Centro de prensa La enfermedad de Chagas (trypanosomiasis americana). Oms-N°340. 2013;1–5.
15. Silveira CA, Abad Franch F, Schmunich GA, Luquetti AO. Programa Regional para el Control de la Enfermedad de Chagas en America Latina. Iniciativa de bienes publicos regionales. BID/OPS/IDRC/CNZ. Montevideo, Uruguay; 2010. 242 p.
16. FLAP. Congreso Latinoamericano de Parasitología. In Quito-Ecuador; 2013.

17. Republica 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/Guia_de_atencion_clinica_de_chagas_2010.pdf
18. 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
19. 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
20. Instituto Nacional de Parasitología "Dr Mario Fatala 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_27_092012.pdf
21. Pérez-Molina JA, Rodríguez-Guardado A, Soriano A, Pinazo M-J, Carrilero B, García-Rodríguez M, et al. Guidelines on the Treatment of Chronic Coinfection by Trypanosoma cruzi and HIV Outside Endemic Areas. HIV Clin Trials [Internet]. 2011 Dec 6 [cited 2017 Jun 28];12(6):287–98. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1310/hct1206-287>
22. 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>
23. 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>
24. Voller A, Draper C, Bidwell D, Bartlett A. MICROPLATE ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR CHAGAS' DISEASE. Lancet [Internet]. 1975 Feb [cited 2017 Jun 28];305(7904):426–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673675914920>
25. Camargo ME. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of Trypanosoma cruzi in a slide test. Rev Inst Med Trop Sao Paulo [Internet]. [cited 2017 Jun 28];8(5):227–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4967348>
26. Umezawa ES, Nascimento MS, Kesper N, Coura JR, Borges-Pereira J, Junqueira AC, et al. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of Trypanosoma cruzi in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. J Clin Microbiol [Internet]. 1996 Sep [cited 2017 Jun 28];34(9):2143–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8862574>