

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA
LICENCIATURA EN LABORATORIO CLÍNICO



SEROPOSITIVIDAD A ANTICUERPOS CONTRA *TRYPANOSOMA CRUZI* EN DONANTES QUE ASISTIERON AL BANCO DE SANGRE DEL INSTITUTO SALVADOREÑO DEL SEGURO SOCIAL HOSPITAL MÉDICO QUIRÚRGICO Y ONCOLÓGICO EN EL AÑO 2017.

TRABAJO DE GRADUACIÓN PREVIA OPCIÓN AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN
LABORATORIO CLINICO

PRESENTADO POR

CLARISSA ROCÍO LÓPEZ LÓPEZ

GABRIELA MARÍA MEJÍA ARIAS

LILIAN GEORGINA MENJÍVAR AGUILAR

ASESOR

LICENCIADO LUIS ROBERTO PANIAGUA

CIUDAD UNIVERSITARIA, OCTUBRE DE 2018

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

Autoridades académicas

Rector

Msc. Roger Armando Arias

Vicerrector académico

Dr. Manuel de Jesús Joya

Vicerrectora administrativo

Ing. Agr. Nelson Bernabé Granados

FACULTAD DE MEDICINA

Decana

Dra. Maritza Mercedes Bonilla Dimas

Vicedecana

Licda. Nora Elizabeth Abrego de Amado

ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

DIRECTORA

Licda. Dalide Ramos de Linares

LICENCIATURA EN LABORATORIO CLÍNICO

Directora

Msp. Miriam Cecilia Recinos de Barrera

Agradecimientos

Agradezco a Jehová Dios por permitirme culminar mis estudios con éxito, por la fortaleza, sabiduría y entendimiento que me brindaste cuando lo necesite, por no abandonarme en el camino y por bendecirme con la familia que me diste.

A mis padres Sigfredo Antonio López y Rosario de la Paz López por forjarme como una persona de bien, por brindarme la confianza, amor y comprensión, por estar cuando los necesito, por creer en mí y en mis capacidades, gracias por ayudarme a cumplir mis metas.

A mi tía María Ángela Chinchilla por su apoyo, consejos, cariño, y las risas que me han ayudado a sobrellevar los problemas.

A mi hermano Fredy López mi confidente y amigo incondicional, por estar a mi lado en los momentos más difíciles y en los más reconfortantes.

A mis hermanas Aura y Rebeca por haber estado conmigo en este proceso.

A mis amigas y compañeras de tesis Gabriela Arias y Georgina Menjivar, gracias por la paciencia, los conocimientos, las alegrías que compartimos a lo largo de la carrera, por tener siempre una actitud positiva frente a todas las adversidades que tuvimos al momento de realizar nuestro proyecto de graduación, por tener siempre toda la disposición de trabajar y hacer las cosas bien, me quedo con la satisfacción de que hicimos un buen trabajo y casi nunca discutimos. Son excelentes profesionales y muy buenas amigas.

A mi mejor amiga Fátima Córdova que me ha acompañado a lo largo de este camino, brindándome su apoyo y una sincera amistad.

A mi amigo Arturo Aragón que en paz descanse, gracias por los consejos, por la madurez que trataba de transmitirme. Por la compañía y por los momentos vividos.

Clarissa López

Agradecimientos.

Quiero agradecer primeramente a Dios por todas las bendiciones recibidas hasta el día de hoy.

A mi madre por ser el principal apoyo en mi vida, por ayudarme en mi formación académica, y por siempre estar en cada uno de mis logros, sueños y metas cumplidas hasta este día, por demostrarme siempre su apoyo y cariño incondicional, sin ella nada de esto fuera posible.

A toda mi familia que siempre está cerca de mí, apoyándome en cada uno de mis logros y que comparten esta alegría.

A mis compañeras de tesis, amigas y futuras colegas de la profesión Georgina y Clarissa por ser parte de este trabajo de graduación que, sin duda, fueron un rol importante en el trabajo realizado por compartir sus conocimientos, alegrías y tristezas durante nuestra formación académica y a cada una de las personas que ayudaron a que el trabajo de graduación se realizara de manera exitosa.

A la Universidad de El Salvador por formarme académicamente en especial a la Facultad de Medicina por permitir ser parte de ella, a los Licenciados y Licenciadas que fueron parte de esta formación que con sus conocimientos y aportaciones me ayudaron a ser mejor día con día.

Gabriela Arias

Agradecimientos

A Dios Todopoderoso por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos más difíciles, por darme sabiduría, perseverancia e iluminar mi mente para lograr cumplir un objetivo más en mi vida.

A mis padres Mario Menjívar y Marta Lilian de Menjívar, por los valores que me han inculcado, por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida. Por apoyarme en toda mi formación académica, y brindarme sus mayores ánimos para que cumpliera con mi meta. Sobre todo, ser un excelente ejemplo de vida a seguir.

A mi hermano Gustavo Menjivar, por brindarme su apoyo a no desfallecer en cumplir mis sueños, por ser un ejemplo de desarrollo profesional a seguir, por llenar mi vida de alegría y por motivarme día a día, en todo momento de mi carrera para ser mejor profesional.

A toda mi familia en general, por brindarme apoyo moral en todo momento, en especial a mi madrina Mariana Aguilar, por llevarme en sus oraciones para poder cumplir con esta meta. A mi Abuelo Apolinar Menjivar de grata recordación, por ser una gran motivación en mi vida para cumplir esta meta.

A mis compañeras de tesis, amigas y futuras colegas, Gabriela Arias y Clarissa López, por compartir muchos momentos durante la formación académica, como el desarrollo de este trabajo de graduación, por la amistad que hemos forjado.

A la Universidad de El Salvador por haberme permitido formarme en ella, a los Licenciados y Licenciadas que, de manera directa o indirecta, fueron los responsables de realizar su pequeño aporte, que el día de hoy se verá reflejado en la culminación de mi paso por la Universidad.

Georgina Menjivar

Contenido

Introducción.....	9
Planteamiento del problema.....	10
Justificación	12
Objetivos.....	13
Hipótesis.....	14
Marco Teórico.	15
Resultados.....	35
Discusión.....	45
Conclusiones.	49
Recomendaciones	50
Referencias Bibliográficas.....	51
Anexos	53

Introducción

La enfermedad de Chagas es causada por el parásito sanguíneo extracelular llamado *Trypanosoma cruzi*, es un flagelado que se encuentra circulando en sangre de personas y animales infectados, especialmente en periodos agudos e iniciales de la infección.

La transmisión es principalmente por vía cutánea, que ocurre cuando la chinche efectúa su picadura y a la vez defeca, luego el humano por una acción espontánea se inocula accidentalmente al rascarse.

Los vectores que transmiten el parásito son *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata*, siendo este último el de mayor importancia en El Salvador.

La tripanosomiasis americana es una enfermedad crónica que se presenta en forma sintomática y asintomática, clínicamente se reconocen tres etapas de la enfermedad y cada una de ellas con sus signos y síntomas particulares.

En la presente investigación, se pretendió determinar el porcentaje de donantes seropositivos a los anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* que asistieron al banco de sangre del Instituto Salvadoreño del Seguro Social Hospital Médico Quirúrgico y Oncológico en el año 2017.

Planteamiento del problema

La enfermedad de Chagas es una patología de amplia distribución geográfica en Latinoamérica.

Las tripanosomiasis son producidas por protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* y transmitida, principalmente por vía cutánea a través de la defecación del vector; y la inoculación accidental de uno de los estadios que presenta el parásito. Los artrópodos implicados son: *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata*, siendo este último el de mayor importancia en El Salvador.

Esta parasitosis también se puede adquirir por vía transfusional, por trasplantes de órganos y vía placentaria.

Tripanosomiasis es una enfermedad crónica, que presenta forma sintomática y asintomática, clínicamente se reconocen tres etapas de la enfermedad; forma aguda, indeterminada y crónica.

El proceso de selección de donantes de sangre depende de una buena entrevista y correcta realización de las pruebas serológicas de tamizaje que deben ser sensibles y específicas para las diferentes enfermedades: hepatitis B y C, HIV, Sífilis y Chagas.

Actualmente el banco de sangre del Instituto Salvadoreño del Seguro Social Médico Quirúrgico, realiza los procedimientos necesarios para la detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*, ya que cuenta con una base de datos que les permite proporcionar información necesaria de forma inmediata del total de donantes seropositivos a la enfermedad de Chagas en el año 2017, además de conocer el grupo etareo y distribución geográfica en El Salvador mayormente afectado.

¿Cuál es el porcentaje de donantes seropositivos a anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* que asistieron al banco de sangre del Instituto Salvadoreño del Seguro Social Hospital Médico Quirúrgico y Oncológico?

¿Cuál es el grupo etareo mayormente afectado?

¿Cuál es la distribución geográfica mayormente afectado/a en El Salvador?

Justificación

Es una parasitosis causada por un protozoo flagelado de la familia *Trypanosomatidae*, transmitida por artrópodos vectores: *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata*.

La transmisión de la enfermedad de Chagas se realiza por la defecación del vector e inoculación accidental del parásito.

La tripanosomiasis es una enfermedad de amplia distribución geográfica en Latinoamérica; El Salvador es un país en vías de desarrollo, su situación socioeconómica favorece a la prevalencia de la enfermedad.

Uno de los objetivos de esta investigación fue conocer el porcentaje de donantes rechazados en el banco de sangre del Instituto Salvadoreño del Seguro Social Hospital Médico Quirúrgico y Oncológico durante el año 2017, por presentar positividad a anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*.

Con los datos obtenidos en esta investigación se estableció la prevalencia de la enfermedad de Chagas en los donantes, además de determinar el grupo étnico y distribución geográfica mayormente afectado de nuestro país.

El estudio fue factible ya que se contó con el apoyo técnico administrativo de la Jefatura del Banco de Sangre del Instituto Salvadoreño del Seguro Social Hospital Médico Quirúrgico y Oncológico.

Objetivos

Objetivo general

- Conocer la seropositividad a anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*, en los donantes de sangre del Instituto Salvadoreño del Seguro Social Hospital Médico Quirúrgico y Oncológico durante el año 2017.

Objetivos específicos

- Encontrar el porcentaje de donantes seropositivos a anticuerpos contra el *Trypanosoma cruzi* que asistieron al banco de sangre del Instituto Salvadoreño del Seguro Social Hospital Médico Quirúrgico y Oncológico en el año 2017
- Verificar cual es el grupo etareo mayormente afectado por *Trypanosoma cruzi* en los donantes atendidos en el Banco de Sangre Instituto Salvadoreño del Seguro Social Hospital Médico Quirúrgico y Oncológico.
- Conocer la procedencia de la población afectada según distribución geográfica mayormente afectada en El Salvador por *Trypanosoma cruzi*.

Hipótesis.

Hipótesis de investigación.

- El porcentaje de donantes seropositivos a anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* será mayor a 0.1%
- El grupo etareo mayormente afectado oscila entre 18-37 años
- La zona central de El Salvador es mayormente afectada por *Trypanosoma cruzi*.

Hipótesis nula

- El porcentaje de donantes seropositivos a anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* será menor a 0.1%
- El grupo etareo mayormente afectado oscila entre 38-60 años
- La zona oriental de El Salvador es mayormente afectada por el *Trypanosoma cruzi*.

Marco Teórico.

La enfermedad de Chagas fue **descubierta** en **1909**, por el **Dr. Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas** (1879-1934) en Brasil. Este médico brasileño, con sus observaciones y experimentaciones de campo, identificó al parásito que provoca la enfermedad, describió a los insectos que lo transmiten y detalló una serie de síntomas que causa en los seres humanos, incluyendo alteraciones cardíacas y del sistema nervioso. Sin embargo, también asoció a dicha infección algunos síntomas que eran producto de otras enfermedades presentes en la zona; estos errores sirvieron de excusa, en algunos ámbitos científicos, para poner en duda el valor de los hallazgos de Chagas.

La historia refiere que Carlos Chagas -perteneciente al equipo del Dr. Oswaldo Cruz (Río de Janeiro)- fue enviado a Lassance (Minas Gerais) para estudiar cuestiones ligadas al paludismo (o malaria). Allí, se interesó por unos insectos que se alimentaban de la sangre de personas y animales domésticos y abundaban dentro de las viviendas del lugar. Encontró que en el tubo digestivo de estos insectos (conocidos con el nombre de *barbeiros* en Brasil) se desarrollaban unos parásitos que llamaron su atención, a los cuales denominó *Schizotrypanum cruzi* (actualmente *Trypanosoma cruzi*). Luego de identificar y describir al parásito hallado en el intestino de las vinchucas, Chagas lo encontró también en la sangre de un gato y luego en una muestra tomada de una niña de dos años que estaba cursando un importante cuadro febril. Allí comenzó su lucha por conocer, y dar a conocer, el grave problema sanitario que ocasionaban a los seres humanos estos parásitos y sus insectos transmisores.

El trabajo de Chagas fue especial en la historia de la medicina, por ser el único investigador que pudo describir por completo una enfermedad infecciosa, es decir, el patógeno, su vector y hospedador, las manifestaciones clínicas y la epidemiología. Cabe mencionar que la enfermedad de Chagas ha sido la única en la que primero se ha descrito el agente etiológico y el transmisor y posteriormente se describió la entidad nosológica

Lo primero que llamó su atención fue la presencia de triatóminos que se encontraban en gran número en las grietas de paredes y techos de las casas de los trabajadores, las cuales contenían desde centenares hasta miles de estos. Al examinar el contenido del intestino de los insectos barbeiros encontró grandes cantidades de tripanosomas. Chagas quiso probar si la picadura del insecto provocaba alguna infección en monos locales, pero como no encontró monos sanos envió triatominos infectados con tripanosomas al Dr. Oswaldo Cruz para que hiciera una inoculación experimental. Un mes después, Chagas encontró en la sangre de un macaco grandes cantidades de tripanosomas no conocidos antes. Posteriormente probó la infección en cobayos, perros, conejos y macacos provocando la muerte de estos.

Luego, estudió el ciclo de desarrollo del tripanosoma en el laboratorio y en el insecto transmisor, pero no encontraba al huésped definitivo para el parásito y decidió hacer más investigaciones. Buscó al parásito en humanos que vivían en habitaciones infestadas por triatóminos; y el 23 de abril de 1908 encontró el primer caso de la enfermedad.

El primer caso de tripanosomiasis americana estudiado y descrito por Carlos Chagas, fue una niña de dos años que había tenido una forma aguda y severa de la enfermedad. En abril de 1961, esta paciente fue sometida a una revisión pertinente y su xenodiagnóstico encontrado positivo (la cepa de *Trypanosoma cruzi* aislada está

ahora en estudio). Todos los resultados de una serie de exámenes fueron sorprendentemente pobres, en relación a las formas conocidas de la enfermedad de Chagas. Este caso, históricamente documentado, parece que señala la posibilidad de infección en el humano por *T. cruzi* durante medio siglo, sin producir manifestaciones clínicas reconocidas”

La década de 1910 marcó el comienzo del trabajo de Salvador Mazza, médico y bacteriólogo argentino que completó los estudios de Carlos Chagas sobre el agente etiológico (*Tripanosoma cruzi*) y sobre el vector de la enfermedad (vinchuca), además de perfeccionar el tratamiento de la misma.

Las investigaciones de Salvador Mazza revalorizaron los trabajos del científico brasileño y sus observaciones fueron de tanta trascendencia que incluso se propuso renombrar a la enfermedad como Enfermedad de Chagas-Mazza.

Más allá de las fechas de las primeras crónicas y las primeras investigaciones, se considera que el Chagas es tan antiguo como la presencia de los seres humanos en el continente americano.

Se han encontrado evidencias de infección con *Trypanosoma cruzi* en momias de hasta nueve mil años de antigüedad halladas en el norte de Chile y el sur de Perú.

En la actualidad sabemos que el parásito que causa la enfermedad de Chagas y los insectos que lo transmiten han co-evolucionado desde hace miles de años. Es decir, que desde entonces se han ido adaptando el uno al otro, de modo que el tripanosoma depende necesariamente de la vinchuca para cumplir su ciclo, mientras que la vinchuca no se ve afectada por esto.

La enfermedad de Chagas en El Salvador.

En 1913, Juan C. Segovia descubrió el primer caso de tripanosomiasis humana en El Salvador. Para confirmar sus hallazgos, y con la sospecha que podría tratarse de una variedad del *Trypanosoma cruzi* descrito por Carlos Chagas en Brasil en 1909, envió varias preparaciones del parásito en sangre coloreadas por el método de Romanowski, a los Profesores Tanón y Wurzt de la Sociedad de Medicina e Higiene Tropical de París y al Dr. Carlos Chagas al Instituto Oswaldo Cruz de Río Janeiro, Brasil. Los Profesores Tanón y Wurzt le confirmaron, “que dada la morfología del parásito y la forma clínica de la enfermedad, podría pensarse en una variedad del *Trypanosoma cruzi*, especial de América Central; tal idea sólo podría confirmarse cuando otros casos sean estudiados en las demás Repúblicas de Centro América”. El Profesor Chagas, en cambio, opinó: que era el mismo parásito descrito en Brasil, aunque sí le llamó la atención que el cuadro clínico descrito por Segovia era muy distinto a las diversas formas de la enfermedad descritas en Brasil. Así mismo, envió al Profesor Neiva del Instituto Oswaldo Cruz de Brasil, por medio del Dr. Luis Hurtado, varios ejemplares del vector capturado en San Salvador, abundantes en ranchos de paja y casas construidas con paredes de tierra”. El Profesor Neiva clasificó la especie como “*Triatoma dimidiata* Latreille (*Maculipennis* Stal)”. Es interesante anotar que Neiva en 1915, reportó la existencia de *R. prolixus* por primera vez en El Salvador, aparentemente de entre los insectos enviados por Segovia por medio del Dr. Luis Hurtado, que habían sido colectados en casas de San Salvador juntamente con la especie *T. dimidiata*.

Como consecuencia de este reporte temprano de *R. prolixus* por Neiva, Zeledón ha planteado la hipótesis que *R. prolixus* fue introducido en el país por un científico salvadoreño, quien aparentemente desarrolló una colonia con huevos del vector suministrados por el Profesor Brumpt de Paris, para su uso como método de

diagnóstico parasitológico (xenodiagnóstico) en el país, tal como él lo hacía en París. Esto permitió, según Zeledón, la diseminación accidental del vector a otros países de Centro América y al sur de México. Sin embargo, el hecho que Neiva probablemente identifico el *R. prolixus* entre los vectores enviados por Segovia, y la falta de información sobre el uso de xenodiagnóstico en El Salvador antes de 1955, hace suponer que el vector fue introducido en el país antes de su descubrimiento accidental por Segovia. Consecuentemente, la hipótesis de Zeledón se debilita, pero esta nueva teoría amerita investigación adicional.

Segovia, indudablemente, era un profesional de la medicina e investigador nato y acucioso. Su experiencia, narrada en 1916, puntualiza los hallazgos científicos logrados: a) Identificación del tripanosoma en sangre en una paciente febril; b) identificación de las formas evolutivas del parásito en el contenido intestinal de la “chinche”; c) inoculación de cobayos con heces del vector positivas, con desarrollo de elevada parasitosis entre 25 y 30 días, sin causar mortalidad, como ocurría en los estudios de Brasil; d) uso del método de laboratorio de centrifugación de 5 ml de sangre, como el método más seguro para descubrir el parásito, en comparación con la “gota gruesa de sangre”, recomendada en esa época por el médico inglés Ronald Ross y el “frotis espeso” sugerido por Costa de Uruguay. En esa publicación presenta las fotografías de *T. dimidiata* y de las formas de *Trypanosoma cruzi* identificadas en sangre humana y en sangre de cobayos. Es interesante conocer la experiencia del Dr. Segovia, narrada después de asistir al “V Congreso Internacional de Medicina Tropical y de Malaria”, realizado en Istanbul, (Estambul), Turquía del 28 de agosto al 4 de septiembre de 1953, en cuyo manuscrito expresa el agradecimiento “a los colegas, amigos y estudiantes de medicina que con su nobleza hicieron posible la representación salvadoreña en Istanbul”. En este

Congreso conoció al Profesor Cecilio Romaña, investigador argentino famoso, “a quien dice le mostré mi trabajo publicado en 1913 (Archivos del Hospital Rosales) donde señalo, por primera vez, el síntoma “eritema”, encontrado en la primera paciente a quien le descubrí el tripanosoma”, y el cual fue posteriormente reportado en pacientes en otros países suramericanos. En el manuscrito mencionado, el Dr. Segovia dice: “Finalmente, repito que me inclino a pensar que el único agente responsable de la Tripanosomiasis o Enfermedad de Chagas es *Trypanosoma cruzi*, nombre dado por su descubridor, el distinguido biólogo Profesor Carlos Chagas”. Este mensaje, enfatizado por el Dr. Segovia, posiblemente era un llamado a sus colegas que insistían en identificar el parásito por él descubierto como “*Trypanosoma segoviense*”.

En relación a las formas clínicas de la enfermedad de Chagas, el Dr. Segovia comenta que en toda América Latina tiene sintomatología similar, lo que indica que el agente que la produce es el mismo: “fiebres, edemas, trastornos intestinales, eritemas, adenitis, etc.” Refiere que él describió como síntomas adicionales: dolores musculares intensos, sensación de fatiga, insomnio, astenia, y convalecencia prolongada.

El trabajo pionero de Luis Manuel Peñalver, investigador venezolano, realizado conjuntamente con María I. Rodríguez, Max Bloch y Guillermo Sancho, miembros de la “Comisión Investigadora de Tripanosomiasis en El Salvador”, marcó la pauta para iniciar en 1955, estudios epidemiológicos orientados a conocer la magnitud de la transmisión de *T. cruzi*, y la distribución de los vectores *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus* en el país. Sorpresivamente en 1997, el Departamento de Control de Vectores del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS) reportó infestación por sólo *T. dimidiata* en localidades investigadas en los 14

departamentos del país. Este resultado, fue confirmado por otro estudio realizado a nivel nacional en 1999-2000 y por los estudios entomológicos basales ejecutados por el Programa de Control Vectorial de la Enfermedad de Chagas, en desarrollo desde 2003 por el MSPAS, con la colaboración de la Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS).

El género *Trypanosoma* fue creado para protozoarios flagelados hallados en la sangre de ranas, pero muchas otras especies de este grupo genérico han sido encontradas parasitando sangre y tejidos de vertebrados como: peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos. Todos los flagelados pertenecientes a este género, en alguna fase de su ciclo evolutivo presentan la forma de tripanosoma, con cuerpo alargado que cubre más o menos ambos extremos, núcleo central, cinetoplasto posterior al núcleo, membrana ondulante, que se inicia en el cinetoplasto y se continua hacia adelante a lo largo de toda la membrana celular, y un solo flagelo que queda libre en la porción anterior del protozoario.

El *Trypanosoma cruzi* es un organismo pleomorfo que tiene dos fases en su ciclo vital, una en el hombre huéspedes reservorios y otra en los insectos transmisores. Su morfología se puede estudiar mejor en preparaciones teñidas por la técnica de Giemsa. En el huésped mamífero se encuentra al organismo en la sangre con la forma típica de tripomastigoto, mientras que en las células del sistema retículoendotelial y de otros tejidos adopta la forma típica de amastigoto, y durante su transformación también en forma de epimastigoto y tripomastigoto.

En la sangre del hombre, *Trypanosoma cruzi* es un tripomastigoto fusiforme, de unas 20 micras de largo. Con el colorante de Giemsa, el citoplasma se tiñe de azul, el

núcleo, el cinetoplasto y el flagelo de rojo violeta. En la sangre existen dos formas: una larga y delgada y otra corta y ancha, pero probablemente no tienen significación sexual. Las dos formas presentan un núcleo situado en el centro del cuerpo y un cinetoplasto, voluminoso en las formas cortas, que aparecen como una masa de color rojo o violeta oscuro y que se encuentran en el extremo posterior.

En las preparaciones se ve que el cinetoplasto consta de un blefaroplasto puntiforme y de un corpúsculo parabasal ovoide y de mayor tamaño. Los tripanosomas asumen la forma característica de "C". Estos tripomastigotos no se dividen en la sangre, solo se multiplican en las células de sistema reticuloendotelial y de otros tejidos en la forma de amastigoto o en las formas de promastigoto o epimastigoto cuando está a punto de abandonar su vida intracelular. La membrana ondulante y el flagelo desaparecen cuando el parásito penetra en una célula, el organismo se multiplica por fisión binaria y produce formas de amastigotos, las cuales, mediante divisiones sucesivas, llenan la célula invadida y la destruyen.

Las formas amastigotas son redondeadas y ovoides, miden 1,5 a 4 micras de diámetro, tienen un núcleo grande de color rubí y un cinetoplasto en forma de bastoncito, o bien esférico, que se tiñe de violeta oscuro o casi negro con tinción de Giemsa.

En el insecto transmisor, el *Trypanosoma cruzi* presenta morfología general común de las fases de epimastigoto y tripomastigoto meta cíclico. Se ve formas de epimastigoto cortas y largas, que tienen el cinetoplasto en el extremo anterior y el núcleo en posición central; formas intermedias con el cinetoplasto en varios niveles del cuerpo, y tripomastigotos meta cíclicos con el cinetoplasto en la terminación posterior y con una membrana ondulante bien desarrollada y un flagelo.

Desde el punto de vista morfológico, esta especie de tripanosoma vive en la sangre como tripomastigoto típico, en las células del sistema retículoendotelial y de otros tejidos del hombre y de varios animales, como amastigoto, y en el intestino de varios insectos, como epimastigoto y tripomastigoto meta cíclico. En el hombre la localización más frecuente está en las células retículoentoteliales del bazo, hígado, ganglios linfáticos y miocardio.

Ciclo vital.

La vida del *Trypanosoma cruzi* consta de dos ciclos de desarrollo: uno en el hombre o huéspedes mamíferos, reservorios y otro en el interior del vector.

El vector de *Trypanosoma cruzi* es un insecto hematófago conocido popularmente como chinches. Estos vectores se infectan al chupar la sangre del hombre o mamífero con tripomastigotes sanguíneos circulantes. Estas formas sufren transformaciones a lo largo el tubo digestivo del vector. Se divide en tres fases; formas redondeadas en el estómago denominadas esferoamastigotes, epimastigotes en el intestino medio, que se multiplican intensamente por división binaria y tripomastigotes meta cíclicos infectantes para el huésped vertebrado. Por lo general, el vector se torna infectante 20 días después de una comida de sangre contaminada y permanece así toda su vida aproximadamente 1 año.

Los triatomíneos infectados, al picar nuevamente al hombre o animales y después de la ingestión abundante de sangre, defecan fácilmente sobre la superficie. Cuando estas deyecciones se frotan sobre la piel contaminan el sitio de la picadura u otro punto lesionado y los parásitos penetran al tejido, las deyecciones infectantes también pueden llegar a la conjuntiva al ser depositadas en la hendidura palpebral o

porque el mismo paciente a través de sus manos, las lleva hasta el ojo u otras mucosas.

Cuando los tripomastigotes meta cíclicos infectantes entran al organismo, son fagocitados por los macrófagos de la región y englobados en el fagosoma, de donde escapan y se dirigen al citoplasma, allí se transforman en amastigotes y se multiplican activamente por división binaria, más tarde se diferencian de nuevo en tripomastigotes, que rompen las células y llegan a la circulación sanguínea y linfática, para luego invadir diversos órganos, en cuyas células penetran y se transforman de nuevo en amastigotes. Esta etapa coincide con la fase aguda de la enfermedad, que dura de 10 a 15 días aproximadamente y se caracteriza por una intensa multiplicación parasitaria en los tejidos y elevada parasitemia. Durante la fase crónica la parasitemia suele ser mínima y predomina el parasitismo tisular. La parasitemia es una etapa obligatoria para poder asegurar la transmisión, pues el vector toma el parásito de la sangre durante sus comidas. La aparición del parásito en sangre ocurre aproximadamente después de 7 a 14 días de la infección. (ver anexo 4)

FASES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS:

Gran parte de la información clínica sobre la enfermedad de Chagas proviene de la experiencia con personas que contrajeron la infección cuando eran niños, a través de la transmisión por vectores. La gravedad y la evolución de la infección podrían ser diferentes en personas que quedaron infectadas en diferentes etapas de su vida y contrajeron la enfermedad de diferentes maneras o a través de diferentes cepas del parásito *T. cruzi*.

La enfermedad de Chagas tiene dos fases: la fase aguda y la fase crónica. Ambas fases pueden ser asintomáticas o ser potencialmente mortales.

La **fase aguda** tiene lugar en las primeras semanas o los primeros meses de la infección. Generalmente pasa desapercibida porque no muestra síntomas o exhibe solo signos y síntomas leves que no son exclusivos de la enfermedad de Chagas. Los síntomas que nota el paciente pueden incluir fiebre, fatiga, dolores corporales, dolor de cabeza y sarpullido. Los signos detectados en la exploración física pueden incluir agrandamiento leve del hígado o el bazo, inflamación de los ganglios e inflamación local (un chagoma), en el lugar por donde el parásito entró en el cuerpo. El marcador más reconocido de la enfermedad de Chagas en su fase aguda se conoce como signo de Romaña, el cual incluye inflamación del párpado en el lado de la cara cerca de la herida dejada por la picadura o donde fueron depositadas las heces del insecto, las cuales pueden haber entrado al ojo por accidente si el paciente se restregó la cara. Aún si los síntomas aparecen durante la fase aguda, por lo general, desaparecen por sí solos, en unas cuantas semanas o meses. A pesar de que los síntomas desaparecen, la infección persistirá si no se le trata. En muy pocas ocasiones, los niños pequeños (<5%) mueren por inflamación o infección grave del músculo cardíaco (miocarditis) o del cerebro (meningoencefalitis). La fase aguda también puede ser grave en las personas con sistemas inmunitarios debilitados.

La **fase crónica**: La fase crónica aparece en un 20 a 40% de los pacientes asintomáticos, es decir, que durante años han albergado el parásito sin mostrar síntomas. En esta fase, las principales complicaciones aparecen en músculos estriados, como el corazón o la musculatura gastrointestinal. En ambos casos, se apreciará un aumento del tamaño de las vísceras

La infección puede permanecer asintomática durante décadas o incluso de por vida.

Sin embargo, algunas personas presentan:

- **complicaciones cardíacas**, las cuales pueden incluir agrandamiento del corazón (*miocardiopatía*), insuficiencia cardíaca, alteración del ritmo o frecuencia cardíaca y paro cardíaco (*muerte súbita*); o
- **complicaciones intestinales**, que pueden incluir un agrandamiento del esófago (*mega esófago*) o del colon (*megacolon*) y pueden causar dificultades para comer o defecar.

El riesgo promedio de presentar una o más de estas complicaciones en el transcurso de la vida es de aproximadamente 30%.

Existen cinco formas de contagio de la enfermedad de Chagas:

- vectorial (a través de las heces del insecto)
- vertical o congénita (de madre a hijo, durante el embarazo)
- transfusiones sanguíneas y trasplantes de órganos
- oral
- accidentes de laboratorio

Transmisión vectorial

La más común de todas las formas de transmisión de la enfermedad de Chagas es la que se produce a través de las heces del insecto al que en algunos países se conoce como vinchuca y en otros como chinche, chipo, pito, barbeiro o chichaguazu.

Cuando el insecto pica a una persona para alimentarse con su sangre, defeca muy cerca de la picadura. En las heces que deposita sobre la piel se encuentra el parásito, que pasa a la sangre cuando la persona se rasca. Esta forma de

transmisión se conoce como transmisión vectorial. En ocasiones las heces pueden pasar a través de las mucosas, si se han depositado cerca de las mismas (por ejemplo, a través de la mucosa ocular).

Transmisión vertical

Otra forma de transmisión bastante frecuente es la transmisión de madre a hijo. Una mujer embarazada que tiene el Chagas puede transmitirlo a su bebé. Este tipo de transmisión se puede producir también fuera de las zonas endémicas de la enfermedad. Es imprescindible que los hijos de cualquier mujer portadora de Chagas se realicen la prueba, aunque hayan nacido fuera de América Latina. A pesar de ello, la enfermedad de Chagas no es un obstáculo para que tanto el embarazo como la lactancia se puedan desarrollar con normalidad.

Transfusiones y trasplantes

Una persona que reciba una transfusión de sangre (o derivados) o un trasplante de órganos de una persona que tenga la infección podría contraer la enfermedad de Chagas.

Hoy en día se están estableciendo mecanismos de control en los bancos de sangre y en los procesos de donación de órganos para evitar estas formas de transmisión, pero el proceso de implementación no se realiza a la misma velocidad en todos los países.

Oral

También es posible contraer el Chagas al ingerir comida o bebida contaminada por el parásito. Este tipo de transmisión es menos frecuente y se da únicamente en

países donde existe el insecto que transmite la enfermedad. Concretamente, se han descrito casos al beber zumos de açai, caña de azúcar o guayaba contaminados.

Accidentes de laboratorio

En profesionales que manipulan muestras que contienen el parásito o que trabajan directamente con el insecto vector se podría contraer accidentalmente la enfermedad por inoculación debida a pinchazos o exposición a mucosas. Este mecanismo de transmisión es muy poco frecuente.

Diagnóstico

Diagnóstico parasitológico

Los métodos para el diagnóstico de la enfermedad se dividen en métodos parasitológicos y métodos serológicos.

Métodos parasitológicos:

Se basa en la detección directa del parásito o de sus productos. La detección tradicional de *T. cruzi* se realiza mediante la observación directa de los tripomastigotes en una muestra de sangre, ya sea en un examen en fresco, en una extensión o gota gruesa teñida con Giemsa o después de realizar la prueba de Strout.

Concentrado de Strout: consiste en concentrar los parásitos a partir de 3 ml de sangre recogida sin anticoagulante, con incubación a 37 °C durante 1 h para que se retraiga el coágulo y los tripomastigotes queden suspendidos en el sobrenadante. Tras varios ciclos de centrifugación, primero para eliminar los hematíes residuales y luego para concentrar los parásitos, se analiza el sedimento a 40x. Una variante de

este procedimiento y de gran utilidad para el diagnóstico de infecciones congénitas es la técnica del tubo capilar heparinizado o microhematocrito.

Microhematocrito: esta prueba consiste en el análisis del movimiento de los parásitos en la interfase entre el paquete de hematíes y el plasma de 4 a 6 capilares.

Para la identificación morfológica y la diferenciación con *T. rangeli*, es necesario analizar las preparaciones teñidas con Giemsa. Los tripomastigotes de *T. cruzi* se caracterizan por un kinetoplasto prominente, que da la sensación de estar pintado por encima del cuerpo del parásito. Sin embargo, no se puede descartar la dificultad de la diferenciación morfológica de estas 2 especies; por ello, en estos casos es aconsejable recurrir a técnicas moleculares. No obstante, este inconveniente se da principalmente en la fase aguda de la infección y en zonas en las que ambos protozoos son coendémicos .

Cuando la parasitemia es baja, característica de la etapa crónica, es imprescindible recurrir a técnicas que permiten amplificar la presencia del parásito, o de alguno de sus componentes. Un procedimiento que posibilita alcanzar este objetivo es el xenodiagnóstico.

Otro recurso que permite multiplicar el número de parásitos a partir de una muestra de sangre es el cultivo. Durante la fase aguda es posible cultivar volúmenes pequeños de muestra en medio NNN (Novy-MacNeil-Nicolle) tradicional. Cuando la infección alcanza la etapa crónica, el rendimiento es óptimo cuando se utiliza hasta 30 ml de sangre, en series de 2 a 3 réplicas realizadas en días distintos, y el procesamiento es inmediato. La sangre recogida con anticoagulante se centrifuga para separar el paquete de hematíes y el plasma que contiene las células blancas y las plaquetas. Los hematíes después de un lavado con medio LIT (liver infusion

tryptose) se distribuyen en 6 tubos que contienen 3 ml de medio LIT. Por otro lado, las células suspendidas en el plasma se concentran mediante un ciclo de centrifugación y después se cultivan con 3 ml de medio LIT. Todos los tubos se mantienen a 27 °C y se revisan semanalmente. Dependiendo de la parasitemia inicial, el tiempo para considerar la prueba negativa es de 180 días. Tanto el xenodiagnóstico como el hemocultivo, además de su interés diagnóstico, son herramientas de gran utilidad para el aislamiento de cepas de *T. cruzi* y posteriores estudios de genética de poblaciones.

Reacción en cadena de la polimerasa.

Recientemente la aparición de la PCR ha sido una alternativa a las técnicas convencionales ya que es capaz de detectar parasitemias de muy baja intensidad e incluso fragmentos de parásito. Existen diferentes PCR que utilizan diferentes dianas del parásito como el minicírculo del kADN y la secuencia repetida del ADN satélite. Los diferentes protocolos de PCR permiten detectar el genoma de un solo parásito e incluso cantidades inferiores. En zonas endémicas la PCR sólo se utilizaba en estudios de investigación, pero actualmente está sustituyendo otros métodos como el xenodiagnóstico. En países no endémicos la PCR es una herramienta habitualmente utilizada en los bancos de sangre, en el control de posible reactivación postrasplante y en el diagnóstico del Chagas congénito. En pacientes en fase crónica la PCR es una prueba complementaria a la serología, de confirmación y también se utiliza para el seguimiento de curación parasitológica posterior al tratamiento. La PCR se puede realizar sobre diferentes tipos de muestra. En fase aguda sobre sangre, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo y a partir de biopsias de tejido cardíaco o bien de placenta o cordón en los casos de congénita.

En los casos de Chagas crónica se puede realizar sobre muestras de sangre o plasma, o de capa leucocitaria. Un requisito para mejorar los resultados de PCR es la conservación de la muestra. Es aconsejable conservar la muestra a 4 °C o congelada. En el caso de sangre total, se debe mezclar con tampón guanidina 6 M-EDTA 0.2 M lo antes posible para preservar el ADN. De esta forma se puede conservar a temperatura ambiente o nevera, se produce la hemólisis de los hematíes, se homogeniza el ADN y se inhibe la acción de las ADNasas. En condiciones óptimas la sensibilidad de la PCR en fase crónica es de un 50 %, aunque según el protocolo utilizado los resultados de sensibilidad son variables. Probablemente estas diferencias sean debidas al volumen de sangre procesada, a los procedimientos de extracción del ADN o a la región de ADN de *T. cruzi* amplificada.

Diagnóstico serológico

El diagnóstico basado en la búsqueda del parásito presenta un notable valor durante la fase aguda de la enfermedad, pero estas técnicas tienen baja sensibilidad durante las fases crónicas, en las que la serología es de gran utilidad y se considera el método de elección.

El diagnóstico serológico se basa en la determinación de inmunoglobulinas (Ig) G totales anti- *T. cruzi*. Por cuestiones prácticas, se denomina convencional cuando se emplea como antígeno todo el parásito (inmunofluorescencia indirecta [IFI]) o una mezcla compleja de antígenos del parásito (hemoaglutinación indirecta [HAI] (ver anexo 3), ensayos inmunoenzimáticos [ELISA] (ver anexo 2)). El diagnóstico serológico es no convencional cuando los antígenos son purificados, recombinantes o péptidos sintéticos. Dentro de este último grupo, destacan las pruebas rápidas en formato de tiras inmunocromatográficas y la aglutinación en tarjeta; con este; con

este tipo de ensayos se requieren de 10 a 15 min para obtener un resultado. A pesar de los avances tecnológicos, ningún ensayo serológico alcanza el 100% de sensibilidad y especificidad, de manera que el diagnóstico serológico de certeza se basa en la concordancia de, por lo menos, 2 técnicas de distinto principio y antígenos diferentes. Cuando los resultados son discordantes, es necesario realizar otras pruebas de confirmación y diagnóstico diferencial con otras enfermedades que pueden generar reacciones falsamente positivas: leishmaniasis mucocutánea y visceral, malaria, sífilis, toxoplasmosis, hepatitis, lupus eritematoso sistémico, esquistosomiasis, artritis reumatoide, paracoccidiodomicosis, mononucleosis y enfermedades autoinmunitarias.

Diseño Metodológico

El tipo de investigación que se realizó en el Banco de Sangre del Instituto Salvadoreño del Seguro Social Hospital Médico Quirúrgico y Oncológico fue de tipo documental, ya que la información se solicitó a la institución antes mencionada.

Según el número de observación:

Fue un estudio sincrónico y retrospectivo.

De acuerdo a la finalidad con la que se analizan los datos: Fue un estudio analítico.

Población y muestra.

La población con la que se trabajó en la investigación, fueron los datos de los donantes atendidos en el banco de sangre del Instituto Salvadoreño del Seguro Social del Hospital Médico Quirúrgico y Oncológico, que fueron de 23,665 donantes que se clasificaron como positivos o negativos a anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en el año 2017, las variables que se utilizarán en la investigación son; edad, y distribución geográfica.

Fuente y obtención de datos:

Los recursos que se utilizaron para la realización de la investigación han sido proporcionados por el banco de sangre del Instituto Salvadoreño del Seguro Social del Hospital Médico Quirúrgico y Oncológico y los resultados son obtenidos de archivos del banco de sangre.

Ventajas:

- Se han realizado otras investigaciones sobre la temática.
- Se brindará accesibilidad a la información.

- Existe abundante información bibliográfica.

Plan de tabulación y análisis de datos.

La información se presentó en tablas y gráficos, en los cuales se realizó un análisis de datos.

Para la presentación de los datos se elaboraron gráficos de pastel, de barras, cuadros de distribución de frecuencia relativa y porcentual, en los cuales se registra la información pertinente a los indicadores de cada variable.

- Porcentaje donantes seropositivos y seronegativos a anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* que asistieron al Banco de sangre del Instituto Salvadoreño del Seguro Social del Hospital Médico Quirúrgico y Oncológico en el año 2017.
- Donantes que asistieron al Banco de sangre del Instituto Salvadoreño del Seguro Social del Hospital Médico Quirúrgico y Oncológico en el año 2017, que resultaron seropositivos y seronegativos a anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* clasificados de acuerdo a grupo etareo.
- Donantes que asistieron al Banco de sangre del Instituto Salvadoreño del Seguro Social del Hospital Médico Quirúrgico y Oncológico en el año 2017, que resultaron seropositivos y seronegativos a anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* clasificados de acuerdo a su domicilio

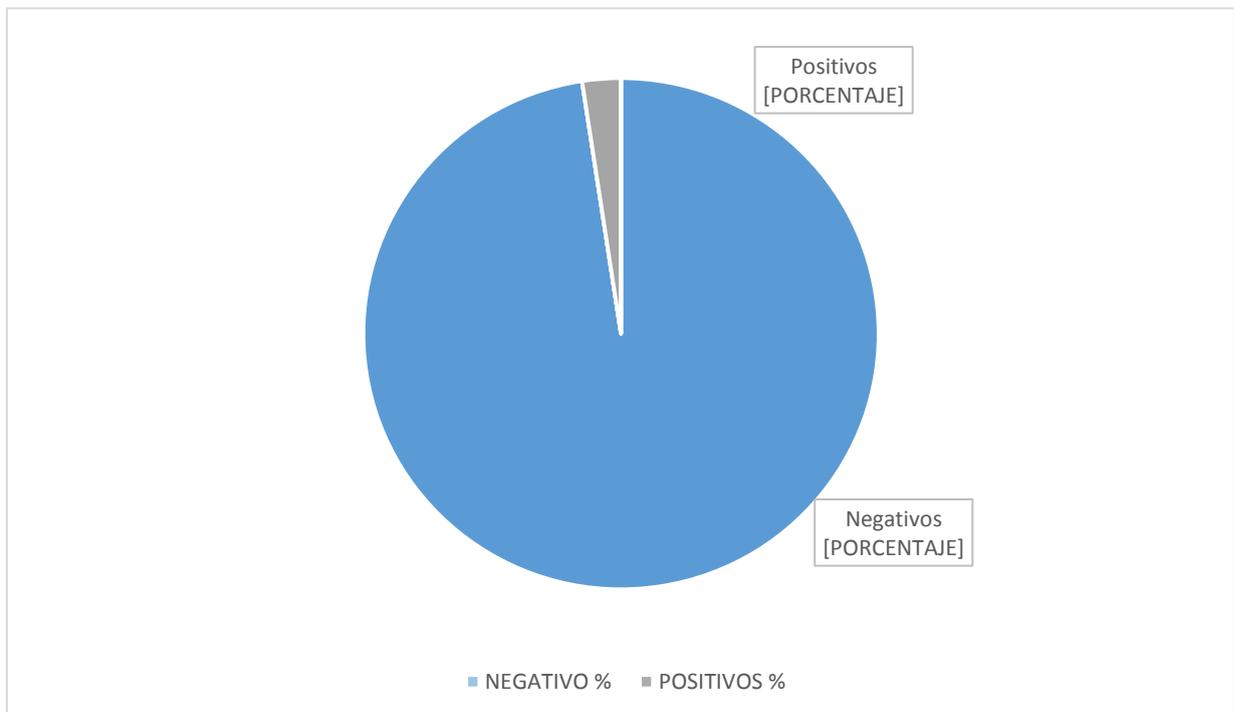
Resultados.

Cuadro y Gráfico n°1

Porcentaje de donantes seropositivos y seronegativos a anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* que asistieron al Banco de sangre del Instituto Salvadoreño del Seguro Social Hospital Médico Quirúrgico y Oncológico en el año 2017

	NEGATIVO		POSITIVOS		TOTAL	
	FR	%	FR	%	FR	%
TOTAL	23093	98%	572	2%	23665	100%

Fuente: Banco de sangre del Instituto Salvadoreño del Seguro Social Hospital Médico Quirúrgico y Oncológico



Fuente: Banco de sangre del Instituto Salvadoreño del Seguro Social Hospital Médico Quirúrgico y Oncológico

En el cuadro y gráfico n°1 según los resultados obtenidos, se observó que en el Banco de Sangre del Instituto Salvadoreño del Seguro Social Hospital Médico Quirúrgico y Oncológico en el año 2017, atendió 23,665 donantes de los cuales;

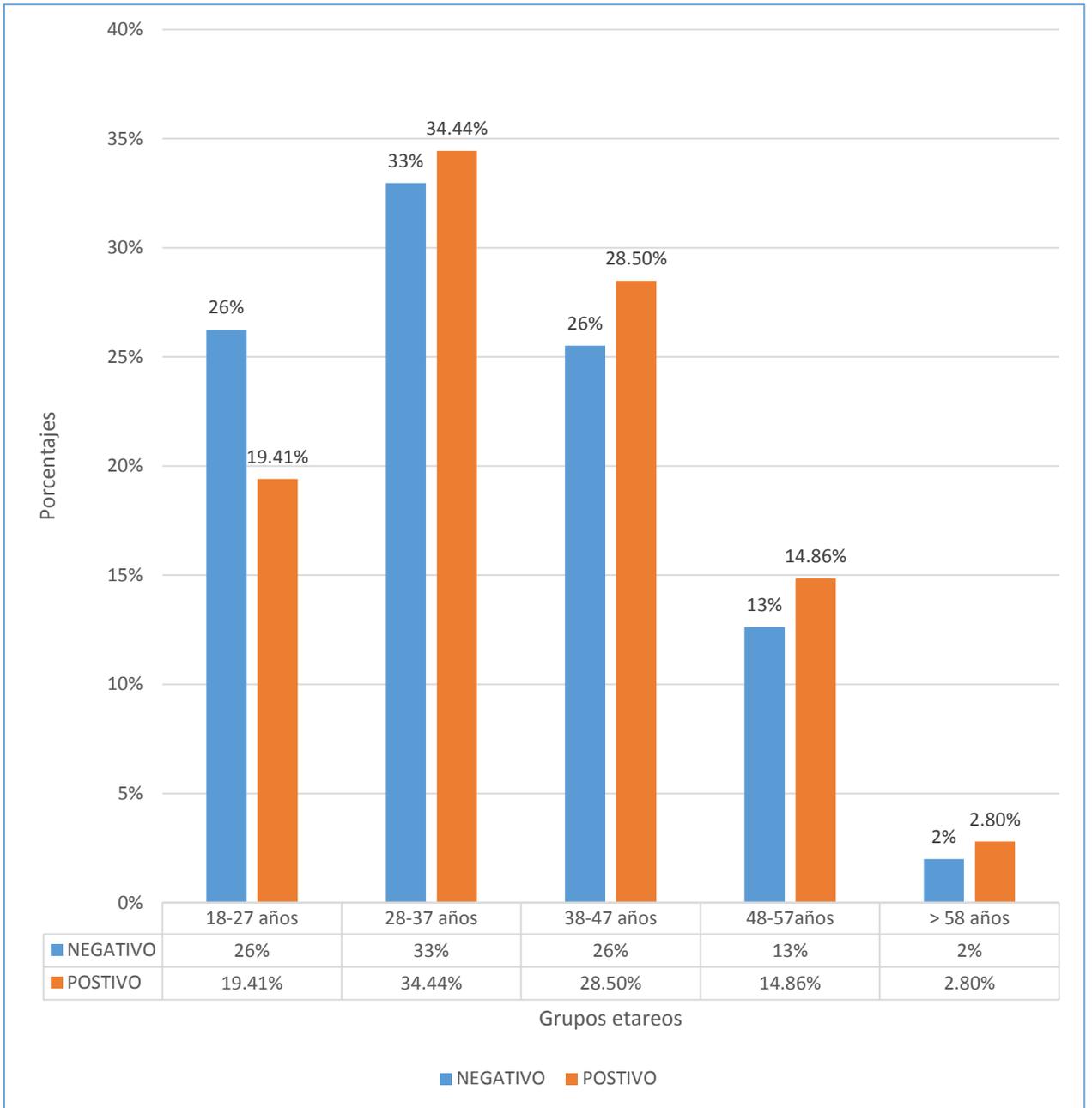
23,093 donantes se clasificaron como seronegativos a anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* equivalente a 98% de la población; por ello 572 donantes resultaron positivos a anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*, equivalente a 2% de la población. Por lo tanto, podemos decir que a pesar de las múltiples campañas de prevención y erradicación del vector transmisor del parásito hematófago del *Trypanosoma cruzi* causante de la enfermedad de Chagas, sigue siendo un problema vigente en nuestra población.

Cuadro y Gráfico n°2

Donantes que asistieron al Banco de sangre del Instituto Salvadoreño del Seguro Social Hospital Médico Quirúrgico y Oncológico en el año 2017, que resultaron seropositivos y seronegativos a anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*, clasificados de acuerdo a su edad.

	NEGATIVO		POSTIVO		TOTAL	
	FR	%	FR	%	FR	%
18-27 años	6062	26%	111	19.41%	6173	26.08%
28-37 años	7614	33%	197	34.44%	7811	33.01%
38-47 años	5893	26%	163	28.50%	6056	25.59%
48-57 años	2915	13%	85	14.86%	3000	12.68%
> 58 años	609	2%	16	2.80%	625	2.64%
TOTAL	23093	100%	572	100%	23665	100.00%

Fuente: Banco de sangre del Instituto Salvadoreño del Seguro Social Hospital Médico Quirúrgico y Oncológico



Fuente: Banco de sangre del Instituto Salvadoreño del Seguro Social Hospital Médico Quirúrgico y Oncológico

En el gráfico y cuadro n° 2, se realizó una clasificación de acuerdo a las diferentes edades y se obtuvieron los siguientes resultados.

El total de donantes atendidos fue de 23,665 de los cuales la mayor frecuencia de donantes proviene de la edad 28 a 37 años, siendo un total de 7811 donantes, de estos 7614 donantes resultaron negativos a anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*, equivalente a 33%, siendo 197 donantes positivos a anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* equivalente a 34.44%. El grupo etareo menos afectado fueron

aquellos donantes mayores de 58 años, los cuales fueron un total de 625 donantes, de estos 609 resultaron negativos equivalentes a 2%, 16 donantes resultaron positivos a anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* que corresponde a 2.8%.

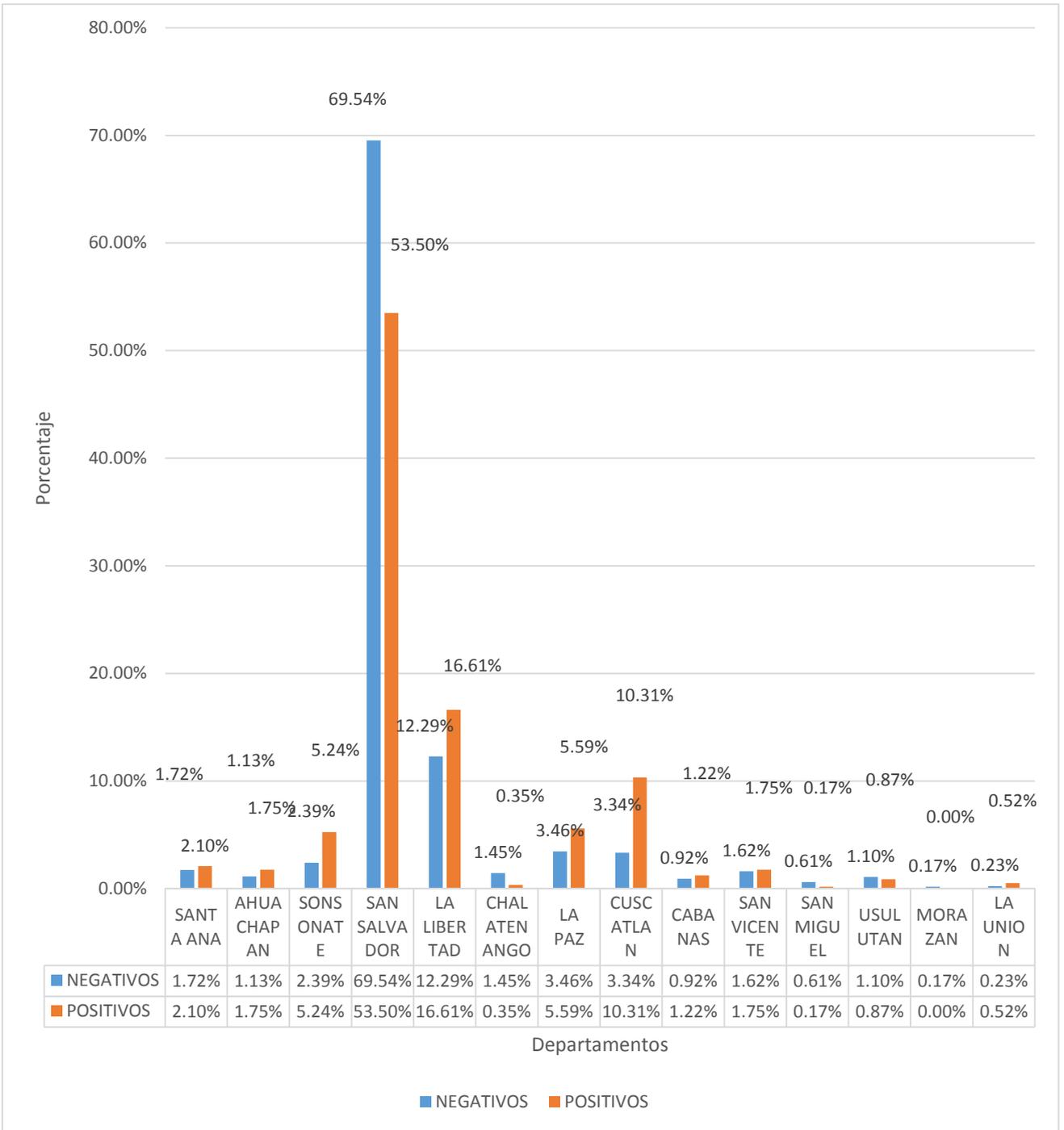
Podemos concluir que en su porcentaje los donantes jóvenes son los mayormente afectados por la enfermedad de Chagas.

Cuadro y Gráfico n°3

Donantes que asistieron al Banco de sangre del Instituto Salvadoreño del Seguro Social Hospital Médico Quirúrgico y Oncológico en el año 2017, que resultaron seropositivos y seronegativos a anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*, clasificados de acuerdo a su domicilio.

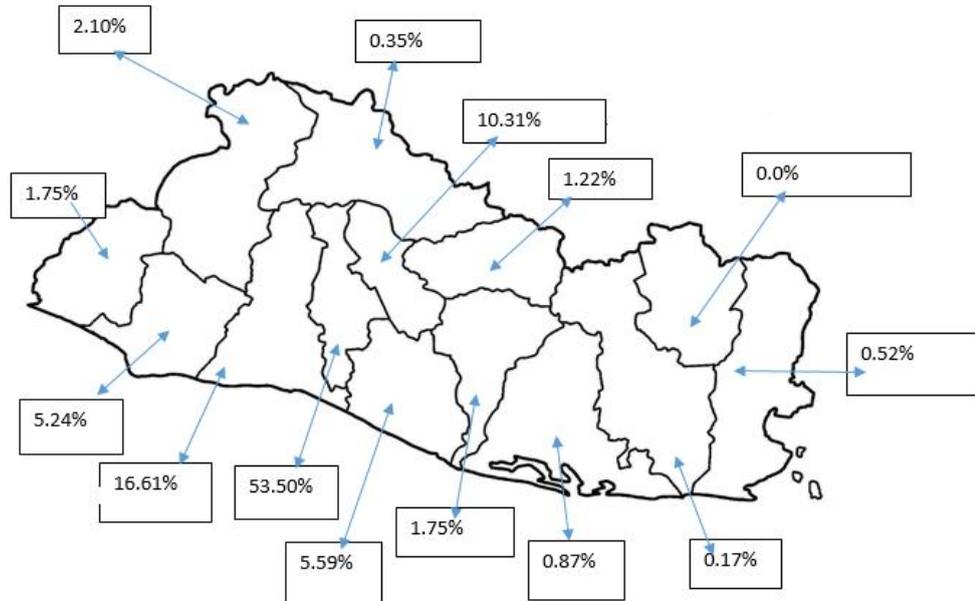
	Negativos		Positivos		Total	
	FR	%	FR	%	FR	%
SAN SALVADOR	16059	69.54%	306	53.50%	16365	69.15%
LA LIBERTAD	2837	12.29%	95	16.61%	2932	12.39%
CHALATENANGO	336	1.45%	2	0.35%	338	1.43%
LA PAZ	800	3.46%	32	5.59%	832	3.52%
CUSCATLAN	772	3.34%	59	10.31%	831	3.51%
CABAÑAS	213	0.92%	7	1.22%	220	0.93%
SAN VICENTE	373	1.62%	10	1.75%	383	1.62%
SANTA ANA	398	1.72%	12	2.10%	410	1.73%
AHUACHAPAN	262	1.13%	10	1.75%	272	1.15%
SONSONATE	553	2.39%	30	5.24%	583	2.46%
SAN MIGUEL	142	0.61%	1	0.17%	143	0.60%
USULUTAN	254	1.10%	5	0.87%	259	1.09%
MORAZAN	40	0.17%	0	0.00%	40	0.17%
LA UNION	54	0.23%	3	0.52%	57	0.24%
	23093	100%	572	100%	23665	100%

Fuente: Banco de sangre del Instituto Salvadoreño del Seguro Social Hospital Médico Quirúrgico y Oncológico

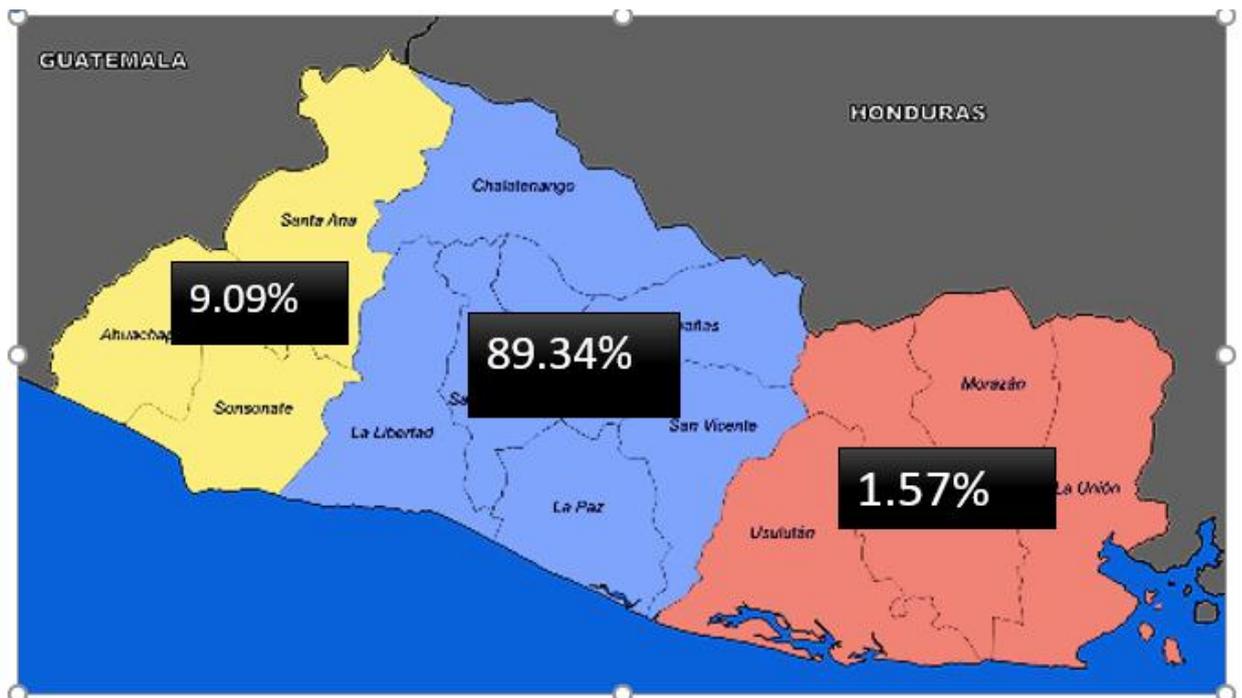


Fuente: Banco de sangre del Instituto Salvadoreño del Seguro Social Hospital Médico Quirúrgico y Oncológico

Porcentajes de donantes seropositivos a anticuerpos contra Trypanosoma cruzi de acuerdo a su domicilio



Porcentajes de donantes seropositivos a anticuerpos contra Trypanosoma cruzi de acuerdo a zonas geograficas en El Salvador



En el gráfico y cuadro n° 3, se realizó una clasificación de acuerdo al domicilio donde residen los donantes y se obtuvieron los siguientes resultados.

El total de donantes atendidos fue de 23,665 de los cuales la mayor frecuencia de donantes proviene del departamento de San Salvador con un total de 16,365, por lo que 16,059 resultaron negativos a anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*, equivalente a 69.54%, fueron 306 donantes positivos a anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* equivalentes a 53.5%. Siendo el departamento con el mayor número de donantes atendidos y positivos a anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*; el segundo departamento afectado por el *Trypanosoma cruzi* es La Libertad. Con un total de 2,932 de los cuales 95 son positivos equivalente a un 16.61%, teniendo como restante 2,837 donantes negativos, equivalentes a 12.29%. El tercer departamento afectado es Cuscatlán con un total de 831 donantes atendidos, de los cuales 59 fueron positivos equivalentes a 10.31%, resultando 772 negativos equivalentes a 3.34%.

Estos fueron los 3 departamentos que tienen mayor población afectada con la presencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*.

Los departamentos menos afectados son La Unión con 57 donantes atendidos de los cuales solo 3 fueron positivos a anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* equivalente a 0.52%, fueron 54 negativos, equivalentes a 0.23%. Morazán es el departamento menos afectado con 40 donantes atendidos sin presencia de donante positivos a anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*, además de tener la menor presencia de donantes.

Al realizar un análisis y verificar que zona del país es la más afectada, podemos demostrar que la zona central formada por: La Libertad, San Salvador,

Chalatenango, La Paz, Cabañas, Cuscatlán y San Vicente, con 89.34% de donantes positivos a anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*. La zona occidental formada por: Santa Ana, Sonsonate y Ahuachapán, con 9.09% positivos de donantes a anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*. La zona oriental conformada por; San Miguel, Usulután, La Unión y Morazán con 1.57% de donantes positivos a anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*.

Resultando así la zona central más afectada por la presencia de este parasito hematófago en donantes que asistieron al Banco de Sangre del Instituto Salvadoreño del Seguro Social Hospital Médico Quirúrgico y Oncológico en el año 2017.

Discusión

Para el estudio que se realizó acerca del porcentaje de donantes seropositivos a anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en donantes que asistieron al Banco de Sangre del Instituto Salvadoreño del Seguro Social Hospital Médico Quirúrgico y Oncológico en el año 2017. Además de clasificarlos en edades y su departamento de residencia. Se tomó como población estudio a 23,665 donantes de sangre que fueron aceptados a los cuales se les realizó la prueba de tamizaje a anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*, se obtuvieron 572 donantes portadores de dichos anticuerpos, resultando 23,093 donantes negativos a anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*.

Según las hipótesis planteadas en nuestra investigación, podemos decir:

Hipótesis de investigación 1.

- El porcentaje de donantes seropositivos a anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* será mayor a 0.1%

Hipótesis nula 1.

- El porcentaje de donantes seropositivos a anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* será menor a 0.1%

De acuerdo a la investigación que hemos realizado, además de toda la información recolectada, se tomó la decisión de rechazar la hipótesis nula, porque al finalizar la investigación podemos decir que el porcentaje de donantes seropositivos a anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* fue de 2%, en consecuencia, rechazamos la hipótesis nula y se acepta la hipótesis de investigación.

Hipótesis de investigación 2.

- El grupo etareo mayormente afectado oscila entre 18-37 años

Hipótesis nula 2.

- El grupo etareo mayormente afectado oscila entre 38-60 años

Al finalizar la investigación, y realizar los diferentes cálculos matemáticos y presentarlos en tablas y gráficos obtuvimos que la población mayormente afectada oscila entre 18-37 años, con 53.85% de donante positivos a anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*, se tomó la decisión de rechazar la hipótesis nula y en consecuencia aceptamos la hipótesis de investigación.

Hipótesis de investigación 3.

- La zona central de El Salvador es mayormente afectada por *Trypanosoma cruzi*.

Hipótesis nula 3.

- La zona oriental de El Salvador es mayormente afectada por el *Trypanosoma cruzi*.

En nuestra investigación queremos conocer cuál es la zona del país más afectada, a través de cuadros y gráficos podemos decir que la zona central conformada por La Libertad, San Salvador, Chalatenango, La Paz, Cabañas, Cuscatlán y San Vicente. Con 89.34% de donantes positivos a anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*, se tomó la decisión de aceptar la hipótesis de investigación y en consecuencia rechazar a la hipótesis nula.

Estos datos fueron detallados en cuadros estadísticos, expresados en porcentaje y clasificándoles en lo establecido en el diseño metodológico y cuyo orden se basa en los objetivos de investigación.

Al comparar esta investigación con un trabajo de graduación realizado en el Hospital Nacional Zacamil Dr. Juan José Fernández en el año 2009; se obtuvieron 3.16% donantes positivos a anticuerpos contra *T. cruzi*, en una población en estudio de 3,161.

En nuestra investigación se obtuvo 2% de donantes positivos a anticuerpos contra *T. cruzi*, en una población en estudio de 23,665. Hay una disminución de casos positivos a anticuerpos contra *T. cruzi*.

En este mismo estudio se investigó el rango de edad más afectado, resultando más afectados los donantes con edad igual o mayor a 55 años (5.34%). En nuestra investigación se obtuvo que el rango de edad más afectado fueron los donantes de 18 a 37 años con un 53.85% podemos observar una variación de la población más afectada de acuerdo a su edad.

Comparando esta investigación con otro trabajo de graduación realizado en la red de bancos de sangre de la zona metropolitana del Ministerio de Salud en el año 2011. Se concluyó que la población más afectada está en las edades de 29-38 años, en nuestra investigación la población más afectada se encuentra en las edades de 18 a 37 años siendo muy similar a las edades afectadas por *T. cruzi* en los diferentes años, se considera esta la edad económicamente productiva.

En esta misma investigación se utilizó el indicador lugar de residencia, donde concluyeron que la zona más afectada por *T. cruzi* fue la zona central del país, siendo los departamentos más afectados San Salvador, La Libertad y Cuscatlán. En nuestra investigación se concluyó que la zona central es también la más afectada por *T. cruzi*, con los mismos departamentos afectados.

Antes se pensaba que la enfermedad era de zonas frías, casas de adobe, región rural, pero por la migración de los habitantes, el cambio climático, contribuyen a la migración del vector y por lo tanto la enfermedad.

Conclusiones.

Según los resultados y análisis de los mismos se concluye que:

- De los 23,655 donantes atendidos en el Banco de Sangre del Instituto Salvadoreño del Seguro Social Hospital Médico Quirúrgico y Oncológico durante el año 2017, 2% de ellos presentaron anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*.
- Los departamentos con mayor incidencia de *Trypanosoma cruzi* en el Banco de Sangre del Instituto Salvadoreño del Seguro Social Hospital Médico Quirúrgico y Oncológico fueron San Salvador, La Libertad y Cuscatlán.
- La edad más afectada que prevalece en los donantes de sangre del Banco de Sangre del Instituto Salvadoreño del Seguro Social Hospital Médico Quirúrgico y Oncológico es entre los 18-37 años siendo el 53.85%

Recomendaciones

A los profesionales y futuros profesionales de salud

- Para futuras investigaciones sobre esta temática tener en cuenta el tamaño de la muestra, tomando a los donantes que acudieron al Banco de Sangre del Instituto Salvadoreño del Seguro Social Hospital Médico Quirúrgico y Oncológico en un máximo de 6 meses para facilitar la recolección, tabulación de datos. Así mismo para brindar información actualizada sobre dicha temática.

Al Ministerio De Salud Pública e Instituto Salvadoreño del Seguro Social.

- Agregar un formulario en la entrevista a los donantes de sangre donde especifiquen las zonas del país donde han vivido en por lo menos los últimos 10 años, así poder identificar y dar seguimiento por parte del comité de epidemiología a los donantes que presentan serologías positivas a *Trypanosoma cruzi*.
- Promover un seguimiento eficaz a los donantes positivos de la enfermedad de Chagas por medio del departamento de epidemiología de Instituto Salvadoreño del Seguro Social.

Referencias Bibliográficas.

- ASH L Y ORIHUEL T. Atlas de parasitología Humana 5° Edición Editorial Medica Panamericana, Buenos Aires, Argentina. 2010 Pág.
- BEAVER, P.C, JUNG R.C CUPP, E.W. Parasitología Clínica. Traducción de la segunda edición por Margarita Varela M. México. Salvat Mexicana Editores. 1990 Pág.
- BOTERO. D Y RESTREPO, M. Parasitosis Humanas. 4° Edición. Medellín, Colombia. Corporación para investigaciones biológicas
- Centro para el control y prevención de enfermedades (en línea) 2017, 22 diciembre 2017, disponible en <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/es/informativa/detallada.html>
- JORGE RUDY, RODRIGUEZ MARIA 2010 Seroprevalencia de anticuerpos contra el *Trypanosoma cruzi* en donantes de sangre atendidos en el Hospital Nacional Zacamil “DR. Juan José Fernández” durante el año 2009. Universidad de El Salvador, El Salvador
- La enfermedad de Chagas. Tripanosomiasis Americana (en línea) 2017, marzo 2017, URL disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>.
- PEÑATE ALBA. TOBAR KATTY, 2011 la enfermedad de Chagas como problema de salud pública a través del tamizaje de los casos positivos de infección por *Trypanosoma cruzi* en los donantes de los cinco bancos de sangre de la zona metropolitana de san salvador enero a diciembre 2010 (tesis de posgrado) Universidad de El Salvador, El Salvador.

- RAUDA DINORA, RODRIGUEZ MEYVI, ROMERO OLGA, 2013 estudio entomológico, parasitológico para la identificación de *Trypanosoma cruzi* y serológico para la detección de anticuerpos anti- *Trypanosoma cruzi* en estudiantes de 5 a 15 años de edad, que asisten al centro escolar cantón las quebradas municipio de san simón, departamento de Morazán en el período de abril a octubre de 2013. (tesis de pregrado) Universidad de El Salvador, El Salvador.
- RIERA CRISTINA, Diagnostico de laboratorio de la enfermedad de Chagas, Educación continuada en el laboratorio clínico. Barcelona España, vol. 16. abril 2013. Pág. 82-92

Anexos

Anexo 1. TECNICA ARCHITECT

ARCHITECT Chagas es un análisis quimio luminiscente de micro partículas para la detección cualitativa de anticuerpos frente a *Trypanosoma cruzi* en suero y plasma humanos. El ensayo ARCHITECT Chagas se utiliza como ayuda en el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*

Resumen y explicación del ensayo

Existe tres formas morfológicas en el ciclo biológico de *T. cruzi* epimastigote, amastigote y tripomastigote la mayoría de las proteínas de *T. cruzi* se expresan en las tres formas morfológicas. El ensayo ARCHITECT Chagas se basa en proteínas recombinantes híbridas incluyen 14 regiones antigénicas distintas que representan ampliamente las tres formas morfológicas. estas proteínas recombinantes contienen tanto antígenos reconocidos por los anticuerpos presentes en las personas con infección aguda por *T. cruzi* como aquellas que padecen la enfermedad de Chagas de forma crónica.

Principios biológicos del procedimiento.

El ensayo ARCHITECT Chagas es un inmunoanálisis de dos pasos que utiliza a tecnología de inmunoanálisis quimio luminiscente de micro partículas (CMIA) con protocolos de ensayos flexibles denominados Chemilex para la detección cualitativa de anticuerpos IgG frente a *T. cruzi*.

En el primer paso se combina muestra y el diluyente del ensayo. Después se combina la mezcla de a muestra con as micro partículas paramagnéticas recubiertas

con antígenos recombinantes de *T. cruzi*. Los anticuerpos frente al *T. cruzi* presentes en las muestras de unen a las macropartículas recubiertas de antígenos recombinantes. Después del lavado se añade el conjugado de anticuerpos anti IgG humanos marcados con acridinio para crear una mezcla de reacción.

Las soluciones preactivadoras y activadora se añaden a la mezcla de reacción después de otro ciclo de lavado. La reacción quimio luminiscente resultante se mide en unidades relativas de luz (URL). Existe una relación directamente proporcional entre la cantidad de anticuerpos frente al *T. cruzi* presentes en las muestras y las URL detectadas por el sistema óptico del ARCHITECT/system.

La presencia o ausencia de anticuerpos frente al *T. cruzi* en las muestras se determina comparando las señales quimio luminiscente de la reacción con la señal del punto de corte determinada a partir de una curva de calibración activa, si la señal quimio luminiscente en la muestra es igual o superior a la señal de punto de corte, la muestra se considera reactiva para los anticuerpos frente a *T. cruzi*

Muestra

- Suero humano
- Plasma humano recogido con:
 - Heparina de litio
 - EDTA de potasio
 - Citrato de sodio
 - Heparina de sodio
 - Oxalatos de potasio
- CPDA
- ACD

- CPD

Con anticoagulantes líquidos los valores de los resultados obtenidos en las distintas muestras con pacientes pueden verse disminuidos debido a su efecto de dilución.

El ARCHITECT/system. No puede comparar el tipo de muestra a utilizar por lo tanto el usuario tiene la responsabilidad de comprobar que se haya utilizado el tipo de muestra adecuado con el ensayo.

Condiciones de las muestras

No utilice muestra en las siguientes condiciones:

- Inactivadas con el calor
- Mezcladas
- Intensamente hemolizadas
- Con contaminación microbiana evidente
- Líquidos corporales distintos al suero y al plasma

Para obtener resultados exactos, la muestra del suero y plasma no deben presentar fibrina, comprobar que no hayan burbujas en las muestras.

Preparación del análisis

Mezcle bien las muestras descongeladas en un agitador o invirtiendo los frascos 10 veces compruebe visualmente las muestras.

Antes del análisis y para asegurar la reproducibilidad de los resultados, as muestras deben transferirse a un tubo de centrifuga y centrifugarse a una FRC (fuerza centrífuga relativa) mayor o igual a 10000 durante 10 minutos.

Para el análisis dispense la muestra aclarada en una copa de muestra o en un tubo secundario.

Almacenamiento

Las muestras se pueden almacenar con o sin él coagulo a los eritrocitos durante un máximo de 14 días a una temperatura entre 2° y 8°C o 3 días a una temperatura entre 15° y 30°C

Si el análisis se retrasa por un período de tiempo superior al recomendado para su almacenamiento separar el suero o plasma y almacenar la muestra a una temperatura igual o inferior a -20°C

Resultado

ARCHITECT/system calcula la señal de quimioluminiscencia media del calibrador y almacena el resultado. Estos resultados se expresan mediante la división del resultado de la muestra por el resultado almacenado de calibrador.

Las unidades del resultado para el ensayo ARCHITECT Chagas son S/CO (muestra/punto de corte).

Interpretación de resultados.

- Las muestras con valores S/CO menor a 0.80 se consideran no reactivas para los anticuerpos frente a *T. cruzi*
- Las muestras con valores S/CO mayor o igual 1.00 se consideran reactivas para anticuerpos frente a *T. cruzi*
- Las muestras con valores S/CO mayor o igual a 0.80 y menor a 1.00 se consideran dudosas (zona gris).

Nota: las muestras inicialmente dudosas (zona gris) o inicialmente reactivas deben centrifugarse y realizarse por duplicado.

Resultado del ensayo ARCHITECT Chagas.

Resultado inicial	Resultado de reanálisis	Resultado final	Interpretación
R o GZ	Ambos análisis son NR	NR	No reactiva para anticuerpos frente a <i>T. cruzi</i>
R	Uno o ambos análisis son R	R	Reactiva para anticuerpos frente a <i>T. cruzi</i>
GZ	Ambos análisis son R	R	Reactiva para anticuerpos frente al <i>T. cruzi</i>
GZ	Uno o ambos análisis son GZ	GZ	Realice un ensayo adicional o tome una segunda muestra en un plazo razonable de tiempo y repita el ensayo.
NR	El análisis no es necesario.	NR	No reactiva para anticuerpos frente a <i>T. cruzi</i>

Limitaciones de procedimiento.

Si los resultados del ensayo no son coherentes con los datos clínicos se recomienda realizar otros análisis para confirmar el resultado.

Los anticuerpos heterofilos presentes en el suero humano puede reaccionar con las Ig del reactivo e interferir en el inmunoanálisis in vitro. Aquellos pacientes habitualmente en contacto con animales o con productos provenientes de animales son propensos a esas interferencias.

Las muestras de pacientes que hayan recibido preparados a base de anticuerpos monoclonales de ratón con fines diagnósticos o terapéuticos pueden contener anticuerpos humanos antiratos HAMA. Las muestras que contienen HAMA pueden originar valores anómalos al analizarlos en equipos que utilizan anticuerpos monoclonales de ratón (como lo es en el ensayo ARCHITECT Chagas)

Anexo 2. TECNICA BIOELISA (Biokit de Biorad)

Test de ELISA para la detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en suero o plasma humano.

Sumario

La enfermedad de Chagas es una enfermedad crónica parasitaria causada por un protozoo flagelar, el *Trypanosoma cruzi*. El parásito es transmitido a humanos o a otros mamíferos vía insecto vector, de la familia Reduviidae. La transmisión del *T. cruzi* también puede ser congénita o por transfusión de sangre contaminada o trasplante de órganos. El ciclo de vida del parásito es largo y complejo, con varias etapas de desarrollo en el insecto vector y en el huésped vertebrado. Se reconocen tres etapas de la enfermedad: una etapa aguda corta y una etapa crónica de larga duración, separadas por una larga fase asintomática, llamada fase indeterminada. En la primera y tercera etapa diversos órganos pueden estar afectados y producirse un desenlace fatal. Se estima que hasta un 30% de personas con la forma indeterminada de la infección sufrirán daño cardíaco, digestivo o neurológico transcurridos entre 10 y 20 años. Los anticuerpos aparecen poco después de la infección y aumentan a niveles elevados, pudiendo persistir junto con la infección durante muchos años. bioelisa CHAGAS permite una detección específica y de alta sensibilidad de los anticuerpos anti-*T. cruzi* en las fases aguda y crónica de la enfermedad mediante la técnica de ELISA, gracias al uso de antígenos recombinantes. Se trata de un método económico que puede ser totalmente automatizado para el screening de un gran número de muestras de suero en bancos de sangre y laboratorios clínicos.

Principio

bioelisa CHAGAS es un método inmunoenzimático en el cual se han recubierto los pocillos de una placa de microtitulación con antígenos recombinantes que representan 4 epítomos inmunodominantes de *T. cruzi* preparados con licencia de Corixa Corporation (Patentado en USA). A dichos pocillos se les añade las muestras de sueros o plasmas a analizar. Si en una muestra están presentes anticuerpos específicos frente a *T. cruzi*, se formará un complejo estable con el antígeno que recubre el pocillo. Después de lavar para extraer todo el material no unido se añaden IgG de conejo anti-IgG y anti-IgM humanas marcadas con peroxidasa y, si el complejo antígeno/anticuerpo está presente, el conjugado se unirá con el complejo. Después de un segundo lavado, se añade el sustrato enzimático y el cromógeno. Esta solución desarrollará un color azul si la muestra es positiva. El color azul cambia a amarillo después de parar la reacción con ácido sulfúrico. La intensidad del color es proporcional a la concentración de anticuerpos anti-*T. cruzi*. Los pocillos que contengan muestras negativas no desarrollarán color.

Componentes

1. MCPL MICROPLACA:

12 x 8 pocillos recubiertos con antígenos recombinantes de *T. cruzi*.

2. CONJ 51X CONJUGADO CONCENTRADO:

Anticuerpos de conejo anti-IgG y anti-IgM humanas conjugados con peroxidasa. Contiene colorante rojo, mertiolato sódico al 0,02% y proteínas estabilizadoras. A diluir 1/51 con el diluyente del conjugado antes de usarse.

3. DIL CONJ DILUYENTE DEL CONJUGADO:

Tampón Tris que contiene colorante amarillo, aditivos y mertiolato sódico al 0,02%.
Para diluir el conjugado concentrado.

4. DIL SAMP DILUYENTE DE LAS MUESTRAS:

Tampón Tris con proteínas estabilizadoras, azida sódica < 0,1%, Triton X-100 < 1,0% como conservante y Etilenglicol 8%. Listo para usar.

5. WASH SOLN 10x SOLUCIÓN DE LAVADO CONCENTRADA:

Tampón fosfato concentrado (10x) que contiene Tween 20 al 1% y mertiolato sódico al 0,01%. A diluir 1/10 con agua destilada o desionizada antes de utilizarse.

6. SUBS BUF TAMPÓN SUSTRATO:

Tampón citrato-acetato que contiene peróxido de hidrógeno.

7. SOLN TMB CROMÓGENO:

3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO).

8. CONTROL + CONTROL POSITIVO:

Suero humano inactivado y diluido que contiene anticuerpos contra T. cruzi.
Contiene colorante verde y azida sódica < 0,1% como conservante. Listo para usar.

9. CONTROL - CONTROL NEGATIVO:

Suero humano diluido negativo para anti-T. cruzi. Contiene colorante amarillo y azida sódica < 0,1% como conservante. Listo para usar.

10. H2SO4 1N SOLUCIÓN DE PARADA: (sólo en el kit de 1 placa):

Ácido sulfúrico 1N. Listo para usar.

11. SEALS LÁMINAS ADHESIVAS:

Para cubrir la placa durante las incubaciones.

12. BAG BOLSA DE PLÁSTICO:

Para guardar las tiras sin usar.

Precauciones

bioelisa CHAGAS es para el diagnóstico IN VITRO. Para uso exclusivo por profesionales.

El Diluyente de muestras contiene < 0,1% azida sódica y < 1,0% Triton X-100. A continuación, figuran las correspondientes frases de riesgo (R) y seguridad (S):

R22 Nocivo por ingestión.

S46 En caso de ingestión, acúdase inmediatamente al médico y muéstresele la etiqueta o el envase.

ATENCIÓN: MATERIAL DE RIESGO BIOLÓGICO.

El control positivo ha sido inactivado por calor. Todo el material de origen humano utilizado en la preparación de este producto ha sido encontrado negativo a la presencia de anticuerpos de los virus HIV-1/HIV-2 y HCV, así como a la del antígeno de superficie de la hepatitis B, utilizando un método comercial autorizado. Sin embargo, dado que ningún método puede ofrecer la total seguridad de la ausencia de agentes infecciosos, este producto debe manejarse con precaución:

- No permitir que los reactivos entren en contacto con la piel o los ojos; si esto ocurre, lavar con abundante cantidad de agua.
- Usar guantes.
- No pipetear ningún reactivo con la boca.
- No fumar.
- Depositar todos los materiales usados en recipientes adecuados para material biocontaminante. Los restos de muestras, controles, tampones y reactivos aspirados deben recogerse en un recipiente destinado al efecto y autoclavarse una hora a 121°C, o tratarse con hipoclorito sódico a una concentración final del 10%, durante 30 minutos. (Los restos que contengan ácido deben ser neutralizados antes de añadir el hipoclorito sódico).
- Algunos reactivos de este kit contienen azida sódica como conservante. La azida sódica puede reaccionar con tuberías y desagües de plomo o cobre dando lugar a azidas metálicas altamente explosivas. Al desechar los restos de reactivos, deje correr agua abundante.

Precauciones de manejo:

- Ajustar el lavador al tipo de placa utilizado (fondo plano), para realizar un buen lavado.
- No mezclar reactivos procedentes de diferentes lotes.
- No usar los reactivos una vez hayan caducado.
- No utilice el reactivo si observa algún cambio de apariencia en cualquier componente incluido en el kit.

- Deben extremarse las precauciones para evitar contaminaciones microbianas y contaminación cruzada entre los reactivos.
- Utilizar una nueva punta desechable para pipetear cada muestra o reactivo.
- Es muy importante preparar la solución de sustrato-TMB justo 5-10 minutos antes de ser empleada.

Mantenerla en un recipiente bien tapado y al abrigo de la luz.

- Restos de jabones y/o agentes oxidantes en los recipientes utilizados para la preparación de la solución sustrato-TMB, pueden interferir en la reacción. En caso de que se utilicen recipientes de vidrio, es conveniente lavarlos con ácido sulfúrico o clorhídrico 1N, enjuagarlos bien con agua destilada y secarlos antes de usarlos. Usar preferiblemente material plástico desechable.

Conservación y estabilidad

Los componentes permanecerán inalterados hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, si se conservan entre 2-8°C. La bolsa que contiene la microplaca debe llevarse a temperatura ambiente antes de abrirla para evitar condensación en los pocillos. Una vez abierta la bolsa, la microplaca es estable por 3 meses guardada a 2-8°C en la bolsa de plástico bien cerrada, con la bolsita de silicagel. La solución de lavado, una vez diluida, es estable durante dos semanas si se conserva entre 2-8°C. Una vez diluido, el conjugado debe ser utilizado en el mismo día. Guardar el cromógeno al abrigo de la luz. La solución sustrato-TMB una vez preparada no es estable, por lo que se deben seguir estrictamente las indicaciones para su utilización.

Presentaciones disponibles

- Kit de 1 placa (96 tests), REF 3000-1236.

Contiene: 1 placa, 1 x 0,35 ml conjugado concentrado, 1 x 15 ml diluyente del conjugado, 1 x 30 ml diluyente de

muestras, 2 x 50 ml solución de lavado concentrada, 1 x 14 ml tampón sustrato, 1 x 1,5 ml cromógeno, 1 x 2 ml control positivo, 1 x 3 ml control negativo, 1 x 12 ml solución de parada, 1 bolsa de plástico y láminas adhesivas.

- Kit de 5 placas (5 x 96 tests), REF 3000-1237.

Contiene: 5 placas, 1 x 1,3 ml conjugado concentrado, 1 x 70 ml diluyente del conjugado, 1 x 120 ml diluyente de muestras, 3 x 100 ml solución de lavado concentrada, 5 x 14 ml tampón sustrato, 1 x 1,5 ml cromógeno, 1 x 5 ml control positivo, 1 x 7 ml control negativo, 1 bolsa de plástico y láminas adhesivas.

Material necesario no incluido

- Agua destilada o desionizada.
- Pipetas multicanal y micropipetas (10 µl, 100 µl, 200 µl) y puntas desechables.
- Incubador a 37°C ± 1°C.
- Cronómetro.
- Lector de microplacas con filtro de 450 nm. Recomendable filtro de referencia de 620 ó 630 nm.
- Sistema de lavado manual o automático.
- Solución de parada (kit de 5 placas): ácido sulfúrico 1N. También puede emplearse ácido sulfúrico 2N ó 4N.

Recolección de la muestra

Usar suero fresco o plasma (EDTA). Otros anticoagulantes deben ser comprobados antes de utilizarse. Las muestras pueden ser conservadas durante 3 días entre 2-8°C. Si es por un período de tiempo más largo las muestras deben ser congeladas (-20°C). Debe evitarse congelar y descongelar las muestras repetidamente. Partículas en suspensión deben eliminarse por centrifugación. Los sueros o plasmas no deben ser inactivados por calor, ya que puede conducir a resultados incorrectos.

Procesamiento automático

Esta prueba permite su uso de modo automático o semiautomático en diferentes instrumentos. Es muy importante validar cualquier sistema automático para demostrar que los resultados obtenidos para las muestras son equivalentes a los obtenidos empleándose el ensayo manual. Se recomienda que el usuario valide periódicamente el instrumento. Si encuentra cualquier dificultad en la programación y ajuste de los procesadores automáticos de Biokit, por favor contacte con su distribuidor.

PROCEDIMIENTO (Ver esquema del procedimiento) Operaciones previas

Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (20-25°C) antes de empezar el ensayo. Los reactivos líquidos deben homogeneizarse suavemente antes de usarlos.

Diluir la solución de lavado concentrada 1/10 con agua destilada o desionizada. Para una placa mezclar 50 ml de solución de lavado concentrada con 450 ml de agua. En caso de no utilizar una placa completa preparar el volumen proporcional de solución.

Diluir el conjugado concentrado 1/51 con el diluyente del conjugado, de acuerdo con la tabla 1. Para el kit de 1 placa, si se utiliza la placa entera, añadir 300 µl del conjugado concentrado directamente al vial que contiene 15 ml de diluyente del conjugado. Mezclar suavemente.

TABLA 1

Tiras requeridas	1	2	4	6	8	10	12
Diluyente del conjugado ml	1,0	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0
Conjugado concentrado µl	20	40	80	120	160	200	240

Realización de la prueba

1. Utilizar solamente el número de tiras necesario para el test. Reservar 6 pocillos para blanco y controles. Dosificar 200 µl de diluyente de las muestras al resto de los pocillos. A continuación, dosificar 10 µl de cada muestra en los pocillos previamente designados.
2. Dosificar 200 µl de control negativo a 3 pocillos y 200 µl de control positivo a 2 pocillos. NO DILUIR LOS CONTROLES. YA ESTÁN LISTOS PARA USAR. Dejar un pocillo vacío para el blanco de sustrato.
3. Cubrir la placa con una lámina adhesiva, agitarla suavemente e incubar durante 1 hora a 37°C.

4. Desechar la lámina adhesiva. Aspirar el contenido de los pocillos y llenarlos completamente (aproximadamente 350 μ l) con solución de lavado diluida. Repetir el proceso de aspiración lavado 3 veces más. Asegurarse de que cada columna de pocillos esté en remojo al menos 15 segundos antes del nuevo ciclo de aspiración. Después del último lavado golpear la placa invertida sobre un papel absorbente para eliminar cualquier exceso de líquido en los pocillos.
5. Transferir 100 μ l de conjugado diluido a todos los pocillos de la placa, a excepción del pocillo para el blanco de sustrato.
6. Cubrir la placa con una lámina adhesiva e incubar durante 30 minutos a 37°C.
7. Durante los últimos 5-10 minutos de esta incubación, preparar la solución de sustrato-cromógeno. Para una placa añadir 280 μ l de la solución de cromógeno (TMB) a un vial de tampón sustrato (14 ml) y mezclar bien. Si no se utiliza toda la placa, preparar la cantidad necesaria según indica la tabla 2. La solución final debe ser incolora, descartar en caso de que se vuelva azul.

TABLA 2

Tiras requeridas	1	2	4	6	8	10	12
Tampón sustrato ml	1,0	2,0	4,0	6,0	8,0	10, 0	12,0
Cromógeno (TMB) μ l	20	40	80	12 0	16 0	200	240

NOTA: El TMB está disuelto en DMSO. Dado que la temperatura de fusión del DMSO es de 18°C, el cromógeno debe alcanzar una temperatura de 20-25°C y

agitarse bien antes de usarlo. Es normal que el cromógeno presente un color amarillento.

8. Desechar la lámina adhesiva. Aspirar y lavar la placa como en el punto 4.

9. Añadir 100 µl de sustrato-TMB a todos los pocillos.

10. Incubar sin cubrir durante 30 minutos a temperatura ambiente (20-25°C).

11. Añadir 100 µl de solución de parada a cada pocillo, guardando la misma secuencia y con los mismos intervalos observados en la adición del sustrato-TMB.

12. Ajustar el cero del lector con el pocillo del blanco a 450 nm y leer la absorbancia de cada uno de los pocillos en el plazo máximo de 30 minutos. Se recomienda hacer lectura bicromática utilizando filtro de referencia de 620 - 630 nm.

Control de calidad

Los resultados de un ensayo son válidos si se cumplen los siguientes criterios:

1. Blanco del sustrato.

El valor de absorbancia debe ser inferior o igual a 0,100.

2. Media del control negativo (CNx).

La absorbancia de cada control negativo debe ser menor o igual a 0,200 después de restar el blanco. Si alguno de los valores no entra dentro de este margen debe descartarse y recalcularse la media. Si son dos los valores que están fuera de este margen, la prueba deberá repetirse.

Ejemplo:

Control negativo	Absorbancia
1	0,045
2	0,043
3	0,041
Total	0,129

$$CNx = 0,129/3 = 0,043$$

En este ejemplo no se ha de descartar ningún valor.

3. Media del control positivo (CPx).

La media de la absorbancia de los controles positivos debe ser igual o superior a 0,600 después de restar el blanco. Si la media es inferior a este valor el análisis deberá repetirse.

Ejemplo:

Control positivo	Absorbancia
1	1,536
2	1,551
Total	3,087

$$CPx = 3,087/2 = 1,544$$

Resultados

1. Calcular el valor umbral añadiendo 0,300 a la media del control negativo.

$$\text{Valor umbral} = CNx + 0,300$$

Ejemplo: $CN_x = 0,043$ Valor umbral = $0,043 + 0,300 = 0,343$

2. Dividir la absorbancia de la muestra por el valor umbral.

Positivo: $\text{ratio absorbancia/valor umbral} \geq 1,0$ Negativo: $\text{ratio absorbancia/valor umbral} < 0,9$ Dudoso: $\text{ratio absorbancia/valor umbral} \geq 0,9 \text{ y } < 1,0$

Interpretación de los resultados

Un resultado positivo indica infección por T. cruzi. Debe tenerse en cuenta la historia clínica del paciente.

Limitaciones del procedimiento

Toda muestra que haya dado un resultado positivo o dudoso debe analizarse de nuevo por duplicado. Si el resultado es repetidamente positivo o dudoso, debería analizarse con otra prueba.

Para el correcto funcionamiento del kit debe seguirse estrictamente las instrucciones descritas. Cualquier desviación puede dar origen a resultados aberrantes.

Como en todos los inmunoensayos muy sensibles, existe la posibilidad de resultados positivos que no se repiten. Un resultado negativo no excluye la posibilidad de exposición o infección por T. cruzi.

Características funcionales

Evaluaciones

El funcionamiento del kit bioelisa CHAGAS se ha evaluado en varios estudios en comparación con otros ensayos comerciales analizando muestras de donantes de sangre y muestras previamente clasificadas como negativas o positivas de anticuerpos frente a T. cruzi.

- En una evaluación realizada en un banco de sangre, se probaron 3024 muestras de donantes en paralelo con los métodos utilizados en rutina para el cribado de anticuerpos frente a Chagas (EIA, HA e IFA). De éstas, 21 fueron reactivas con el bioelisa CHAGAS. Siete (7) fueron confirmadas como positivas. Por tanto, la sensibilidad obtenida fue del 100% y la especificidad del 99,5%, considerando todas las muestras inicialmente reactivas.
- En otra evaluación en banco de sangre 2723 muestras se analizaron en paralelo con los métodos utilizados en rutina para el cribado de anticuerpos de Chagas (EIA, HA e IFA). Del total, 72 fueron reactivas con el bioelisa CHAGAS. Dos (2) se confirmaron como positivas verdaderas. Por tanto, la sensibilidad obtenida fue del 100% y la especificidad en el cribado fue del 97,4%.
- En un tercer banco de sangre, 2655 muestras se analizaron en paralelo con los métodos utilizados en rutina para el cribado de anticuerpos de Chagas (EIA, HA e IFA). De éstas, 57 muestras fueron reactivas con el bioelisa CHAGAS. Diez (10) se confirmaron como positivas. En esta evaluación la sensibilidad obtenida fue del 100% y la especificidad en el cribado del 98,2%
- Se analizó un panel de 498 muestras previamente clasificadas como positivas (18) o negativas (480). La sensibilidad obtenida fue del 100% y la especificidad del 98,3%.
- Se ensayó un panel de 115 muestras previamente clasificadas como positivas verdaderas. Los resultados de todas las muestras fueron positivos, obteniéndose una sensibilidad del 100%.

- Se analizaron 796 muestras caracterizadas como negativas, de las cuáles 4 presentaron resultado positivo con el bioelisa CHAGAS. En este estudio la especificidad obtenida fue del 99,5%.

Precisión

Reproducibilidad intra-ensayo:

Los coeficientes de variación obtenidos para los valores de absorbancia de 24 replicados de una muestra positiva fueron del 2,5%, 4,2% y 3,1% en tres lotes estudiados.

Reproducibilidad inter-ensayo:

Tres muestras positivas de distintos niveles se probaron en 3 ensayos diferentes. Los coeficientes de variación obtenidos para los ratios absorbancia/valor umbral de las 3 muestras fueron del 4,6%, 3,5% y 8,7%.

Guía de problemas

Problema	Posibles causas	Solución
----------	-----------------	----------

1. Controles fuera de validación.

1a. Temperatura, incubación o pipeteo incorrecto. Comprobar procedimiento. Repetir el ensayo.

1b. Preparación incorrecta de reactivos, error en las diluciones. Reactivos no mezclados correctamente. Comprobar procedimiento. Repetir el ensayo.

1c. Contaminación cruzada entre controles. Pipetear cuidadosamente. No intercambiar los tapones de los viales. Repetir el ensayo.

1d. Filtro de lectura incorrecto. Comprobar que el filtro de lectura sea de 450 nm. Si no se usa filtro de referencia de 620-630 nm, las absorbancias aumentan aproximadamente 50 mili unidades.

1e. Interferencia en el camino óptico. Comprobar el lector. Limpiar o secar el fondo de los pocillos. Comprobar que no haya burbujas de aire. Repetir la lectura.

1f. Se han utilizado componentes de lotes diferentes. No utilizar componentes de lotes diferentes puesto que están ajustados para cada lote en particular.

1g. Reactivos caducados. Comprobar la caducidad del kit y de sus componentes. No utilizar un kit caducado.

2. Sin color o poco color al final del ensayo. 2a. Uno o más reactivos no añadidos o añadidos en secuencia equivocada. Comprobar el procedimiento. Repetir el ensayo.

2b. Conjugado inactivo: mala conservación. Comprobar si ha habido contaminación, comprobar el procedimiento. Repetir el ensayo.

2c. Microplaca inactiva: conservación incorrecta. Mantener siempre las tiras no utilizadas en la bolsa minigrip, bien cerrada, con el desecante dentro. Repetir el ensayo.

2d. Sustrato inactivo:
conservación o dilución incorrecta.

Contaminación cruzada

con la solución de parada. Utilizar siempre una dilución

fresca de TMB y tampón sustrato. Comprobar el procedimiento. Repetir el ensayo.

Guía de problemas

Problema Posibles causas Solución

3. Demasiado color en todos los pocillos de la microplaca. 3a. Sustrato

contaminado, oxidado o preparado incorrectamente. Comprobar que el sustrato preparado sea incoloro, descártelo si está azul.

Asegúrese que el TMB está completamente líquido antes de utilizarlo. Asegurar la correcta mezcla del TMB en el tampón sustrato. Utilizar viales o contenedores desechables o lavados con

solución ácida. Repetir el ensayo.

3b. Reactivos contaminados o preparados

incorrectamente. Comprobar contaminación (aspecto turbio). Comprobar diluciones. Repetir el ensayo.

3c. Solución de lavado (1x) contaminada. Comprobar la calidad del agua destilada/desionizada utilizada para preparar la dilución. Repetir el ensayo.

3d. Lavado insuficiente o no consistente: Llenado o aspiración insuficiente o no uniforme, número de ciclos de lavado insuficiente. Lavador contaminado.

Comprobar el lavador. Llenar los pocillos hasta el tope y aspirar completamente.

Incrementar el número de ciclos de lavado. Golpear la placa invertida contra papel absorbente. Repetir el ensayo.

3e. Se ha utilizado solución de lavado de otro fabricante. Utilizar sólo la solución de lavado de biokit.

3f. Dilución incorrecta de las muestras. Comprobar el procedimiento.

Repetir el ensayo.

4. Reproducibilidad pobre o elevado número de muestras reactivas que no se repiten.

4a. Problemas de lavado. Ver apartados 3c, 3d, 3e.

4b. Pipetas mal calibradas o puntas mal encajadas. Técnica de pipeteo incorrecta. Utilizar pipetas calibradas con puntas bien ajustadas.

Pipetear cuidadosamente sin burbujas ni salpicaduras.

Repetir el ensayo.

4c. Reactivos muy fríos o no correctamente mezclados antes de usar. Atemperar reactivos y mezclarlos bien antes de utilizarlos.

4d. Corrientes de aire sobre la microplaca durante las incubaciones. Mantener la microplaca protegida de las corrientes de

aire. 4e. Demasiado tiempo en la adición de muestras y/o reactivos. Inconsistencia en los intervalos de

tiempo, burbujas de aire. Desarrollar una técnica uniforme y consistente.

4f. Interferencia en el camino

Anexo 3. Hemaglutinación indirecta (HAI)

SIGNIFICACION CLINICA

La enfermedad de Chagas es una infección parasitaria producida por el *Trypanosoma cruzi*. El diagnóstico de laboratorio depende del estadio en el cual se encuentre la enfermedad. Durante la fase aguda, el diagnóstico se efectúa directamente mediante la comprobación de los parásitos en sangre o por métodos inmunológicos que detecten anticuerpos específicos. Durante la fase crónica, se pueden usar métodos inmunológicos como la reacción de aglutinación de látex, hemaglutinación, aglutinación directa, inmunofluorescencia y últimamente ELISA.

FUNDAMENTOS DEL METODO

La hemaglutinación indirecta (HAI), también llamada hemaglutinación reversa pasiva, se basa en la propiedad que tienen los anticuerpos (que en este caso son anti-T. cruzi) de producir aglutinación específica en presencia de glóbulos rojos sensibilizados con los correspondientes antígenos. En el suero existen anticuerpos inespecíficos (heterófilos) que son capaces de aglutinar glóbulos rojos de distintas especies. Su presencia se investiga enfrentando el suero con GR no sensibilizados. Los anticuerpos interferentes se eliminan mediante tratamiento con 2-mercaptoetanol.

REACTIVOS PROVISTOS

Reconstituyente HAI: solución fisiológica tamponada a pH 7.

Antígeno HAI: liofilizado de glóbulos rojos de carnero sensibilizados con antígenos citoplasmáticos de *T. cruzi*.

GR no sensibilizados: suspensión al 1% de eritrocitos de carnero no sensibilizados, para control de heterofilia.

Buffer HAI: solución fisiológica tamponada con fosfatos a pH 7,5, con colorante inerte.

Solución Proteica: solución de albúmina bovina al 10%.

2-Mercaptoetanol: ampolla con 2-mercaptoetanol (2-ME).

Control Positivo: suero inactivado conteniendo anticuerpos contra *Tripanosoma cruzi*.

Control Negativo: suero no reactivo, inactivado.

REACTIVOS NO PROVISTOS

Solución fisiológica.

INSTRUCCIONES PARA SU USO:

Antígeno HAI: preparar con 6,1 ml de Reconstituyente HAI. Esperar una hora antes de usar mezclando cada 20 minutos para permitir una correcta rehidratación del reactivo. Cada vez que se emplee, homogeneizar mediante agitación evitando la formación de espuma.

GR no sensibilizados: homogeneizar mediante agitación antes de usar, evitando la formación de espuma.

Diluyente de Sueros HAI: agregar 0,2 ml de Solución Proteica cada 10 ml de Buffer HAI. Mezclar, rotular y fechar.

2-Mercaptoetanol: una vez abierta la ampolla, trasvasar el contenido al frasco vacío provisto, el que se deberá tapar inmediatamente después de usar.

2-Mercaptoetanol al 1%: con el 2-ME provisto, preparar una dilución 1/100 con solución fisiológica en cantidad suficiente de acuerdo al número de pocillos que se utilicen. Ejemplo: para 96 pocillos: 25 ul de 2-ME en 2,5 ml de solución fisiológica. Controles Positivo y Negativo: listos para usar.

PRECAUCIONES

- Los Reactivos Provistos son para uso diagnóstico "in vitro".
- Las muestras deben manipularse como si fueran capaces de transmitir la infección.
- Los sueros controles han sido examinados para antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg) y virus de inmunodeficiencia humana (HIV) encontrándose no reactivos. Sin embargo, deben emplearse como si se tratara de material infeccioso.
- Todos los materiales empleados en el ensayo deben ser destruidos a fin de asegurar la inactivación de agentes patógenos. El método recomendado por este procedimiento es autoclavar durante 1 hora a 121o C. Los líquidos de desecho pueden ser desinfectados con hipoclorito de sodio (concentración final 5%) durante por lo menos 60 minutos.
- No intercambiar reactivos de distintos equipos y lotes.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Reactivos Provistos: son estables en refrigerador (2-10o C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja. No congelar.

Diluyente de Sueros HAI: es estable en refrigerador (2-10o C) 5 días a partir de la fecha de su preparación.

2-Mercaptoetanol al 1%: usar inmediatamente después de preparado.

Antígeno HAI: una vez reconstituido es estable durante 2 meses conservado en refrigerador (2-10oC). No congelar.

MUESTRA

Suero

a) Recolección: el paciente debe estar preferentemente en ayunas. Obtener suero de la manera usual. No usar plasma.

b) Aditivos: no se requieren. No agregar conservadores.

c) Sustancias interferentes conocidas: hemólisis o hiperlipemia (con quilomicronemia) producen resultados erróneos.

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: el suero debe ser preferentemente fresco. En caso de no procesarse en el momento, puede conservarse en el refrigerador (2- 10oC) durante no más de 72 hs contadas a partir del momento de la extracción. Para períodos más prolongados de conservación, congelar (a -20o C), evitando reiterar tal procedimiento. Los sueros envejecidos tienden a gelificarse al contacto con el 2-ME, provocando resultados falsos positivos.

MATERIAL REQUERIDO

1-provisto

- 1 frasco vacío (para trasvasar el 2-ME de la ampolla)
- 5 policubetas con 96 pocillos de fondo en U
- Accesorios

2- No provisto

- microdilutores (25 ul) o micropipetas automáticas (25 ul)
- microgoteros (25ul)
- tubos de ensayo y material volumétrico adecuado
- cinta adhesiva
- papel de filtro

RECOMENDACIONES PREVIAS

Microdilutores

- Acondicionamiento previo: antes de usar los microdilutores, sumergirlos en un recipiente con agua destilada y apoyarlos sobre papel de filtro para asegurar una correcta toma de la muestra.
- Lavado: antes de tomar una nueva muestra con los microdilutores, descargar el volumen residual sobre papel de filtro. Luego pasarlos sucesivamente por dos recipientes con agua destilada y apoyarlos sobre papel de filtro.

Policubeta Para eliminar la carga electrostática es necesario pasar un trapo húmedo por la base de la misma.

PROCEDIMIENTO

Seleccionar una policubeta con pocillos sin usar de fondo en U.

I- TITULACION SIN 2-ME

1- Con microgotero de 25 ul, colocar una gota de Diluyente de Sueros HAI en todos los pocillos a usar de la policubeta.

2- Tomar una alícuota de cada suero a ensayar con microdilutores de 25 ul (uno para cada muestra). Colocar cada microdilutor en el primer pocillo y rotarlo por lo menos 10 veces para asegurar una correcta dilución de la muestra.

3- Realizar diluciones seriadas a partir del primer pocillo (dilución 1/2), pasando los microdilutores al pocillo siguiente (dilución 1/4) y así sucesivamente hasta la dilución que se desea investigar (por ejemplo: 1/8, 1/16, 1/32), rotando en cada paso el microdilutor por lo menos 10 veces para asegurar una correcta dilución de la muestra. Si se emplea una micro pipeta automática de 25 ul para la toma y/o dilución de la muestra, homogeneizar por carga y descarga. Transferir 25 ul de pocillo a pocillo hasta la dilución que se desee investigar. Descartar los últimos 25 ul.

4- Colocar en los pocillos conteniendo las diluciones 1/2 y 1/4, una gota (25 ul) de GR no sensibilizados para control de heterofilia.

5- En el resto de los pocillos, agregar una gota (25 ul) de Antígeno HAI.

6- Mezclar aplicando suaves golpes en los laterales de la policubeta.

7- Dejar en reposo, a resguardo de vibraciones, durante 90 minutos.

8- Leer a partir de los 90 minutos. Se puede aumentar la nitidez de la apreciación, leyendo sobre un espejo, iluminando la placa desde arriba e interponiendo un papel blanco y traslúcido entre la policubeta y la fuente de luz.

II- TITULACION CON 2-ME

1- Colocar una gota de suero en el primer pocillo empleando goteros plásticos descartables, manteniéndolos en posición vertical (uno por cada suero).

2- Diluir al 1/2 agregando una gota de 2-Mercaptoetanol al 1% a los mismos pocillos (utilizar un único gotero descartable).

3- Sellar estos pocillos con cinta adhesiva y mezclar aplicando suaves golpes en los laterales de la policubeta.

4- Incubar 30-60 minutos a 37°C o 90 minutos a temperatura ambiente.

5- Retirar la cinta adhesiva, pasar un trapo húmedo por la base de la policubeta y, con microgotero de 25 ul, colocar una gota de Diluyente de Sueros HAI en los restantes pocillos a utilizar hasta la dilución deseada.

6- Realizar los pasos 3 a 8 descritos en la Titulación I.

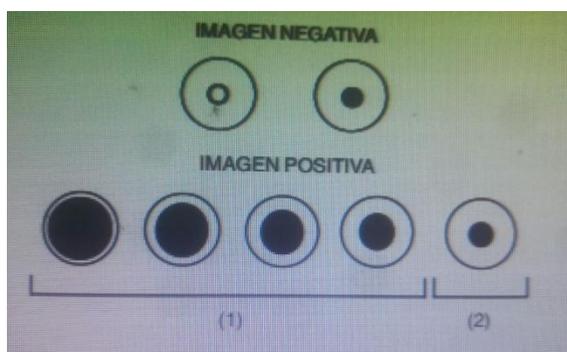
III- ABSORCION CON GLOBULOS ROJOS NO SENSIBILIZADOS

En sueros que presenten heterofilia los anticuerpos heterófilos pueden adsorberse sobre GR no sensibilizados de la siguiente forma: en un tubo de hemólisis colocar 50 ul de GR no sensibilizados provistos + 50 ul de suero en ensayo. Tapar para evitar la evaporación. Dejar la suspensión durante 30 minutos a 37°C agitando extemporáneamente. Luego centrifugar a 2000 rpm durante 5 minutos. Del sobrenadante se toman 50 ul y se emplea como dilución 1/2, colocándola en el primer pocillo. Si se emplea en titulación con 2-ME este pocillo corresponde a dilución 1/4.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

No reactivo: presencia de un sedimento en forma de botón o pequeño anillo de bordes regulares.

Reactivo: formación de una película o manto que cubre el 50% o más del fondo de los pocillos. Si no se usan microdilutores, la imagen del manto puede ser más pequeña.



(1) Manto.

(2) Punto final (50%).

TECNICA SCREENING O DESCARTE POR 1 TITULO

PROCEDIMIENTO

1- Con microgotero de 25 ul, colocar una gota de Diluyente de Sueros HAI en todos los pocillos a utilizar de la policubeta (un pocillo por cada muestra).

2- Sumergir un ansa limpia (provista) en la muestra.

3- Colocar el ansa cargada en el pocillo que contiene el Diluyente de Sueros HAI, rotando la misma para obtener un buen mezclado y distribuir la gota sobre todo el fondo del pocillo. Retirar el ansa y secarla con papel de filtro, lavar en dos recipientes con agua destilada. Secar nuevamente con papel de filtro. Proceder de la misma manera para cada nueva muestra.

4- Agregar con microgotero de 25 ul, una gota de Antígeno HAI reconstituido y homogeneizado a cada pocillo.

5- Agitar la policubeta golpeando con los dedos en las paredes laterales, durante 30 segundos por lo menos, para asegurar un buen mezclado.

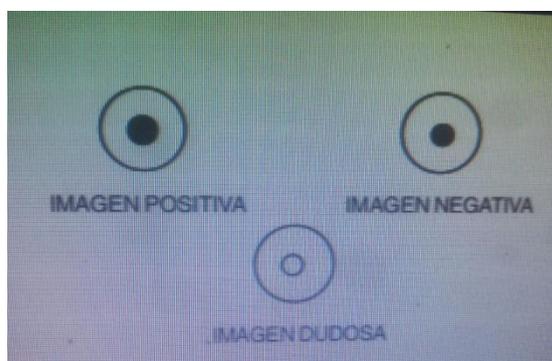
6- Dejar reposar, al resguardo de vibraciones durante 2 horas.

7- Efectuar la lectura. En caso de que la lectura de los resultados se efectúe en un plazo mayor de 2 horas, la policubeta deberá taparse con una cinta adhesiva transparente para evitar evaporaciones

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

No reactivo: presencia de un sedimento en forma de botón.

Reactivo: formación de una película o manto en el fondo de los pocillos. En caso de observar la presencia de un pequeño anillo de bordes regulares, la muestra se considerará dudosa y deberá ser ensayada por otro método.



VALORES DE REFERENCIA

Dentro de las técnicas inmunológicas, la HAI es considerada un método confiable para la determinación de anticuerpos específicos. No obstante, sus resultados, al igual que los de cualquier método serológico, sólo constituyen un dato auxiliar para

el diagnóstico. Es por esta razón que los informes deben ser considerados en términos de probabilidad. En este caso, mayor o menor probabilidad de parasitosis por *T. cruzi*. Cualquier resultado Reactivo debe ser verificado por otra técnica. Recordar el criterio recomendado por el Instituto Fatale Chaben, según el cual el inmunodiagnóstico de la infección deberá hacerse con un mínimo de dos de los siguientes métodos: inmunofluorescencia indirecta, hemaglutinación indirecta, ELISA, aglutinación de partículas (látex), debidamente validados por el Centro Nacional de Referencia.

Procedimiento de titulación

Sueros con títulos mayores o iguales a 1/16, se consideran reactivos para anticuerpos anti-*T. cruzi*. Cuando se observan resultados positivos (sueros reactivos) y además se presenta manto en los pocillos destinados a control de heterofilia (diluciones 1/2 y 1/4), debe realizarse otra titulación con los sueros correspondientes, pero previamente tratados con 2-ME o adsorbidos con GR no sensibilizados. El propósito de estos tratamientos es eliminar la reacción inespecífica. En el primer caso el agente reductor (2-ME) elimina la capacidad aglutinante de los anticuerpos heterófilos, mientras que los GR no sensibilizados los elimina por adsorción.

Técnica de screening o descarte por 1 título

En las condiciones del ensayo, sueros con títulos mayores o iguales a 1/12, se consideran reactivos para anticuerpos anti *T. cruzi*. La imagen que presenta un suero reactivo es de película o manto en el fondo del pocillo.

CONTROL DE CALIDAD

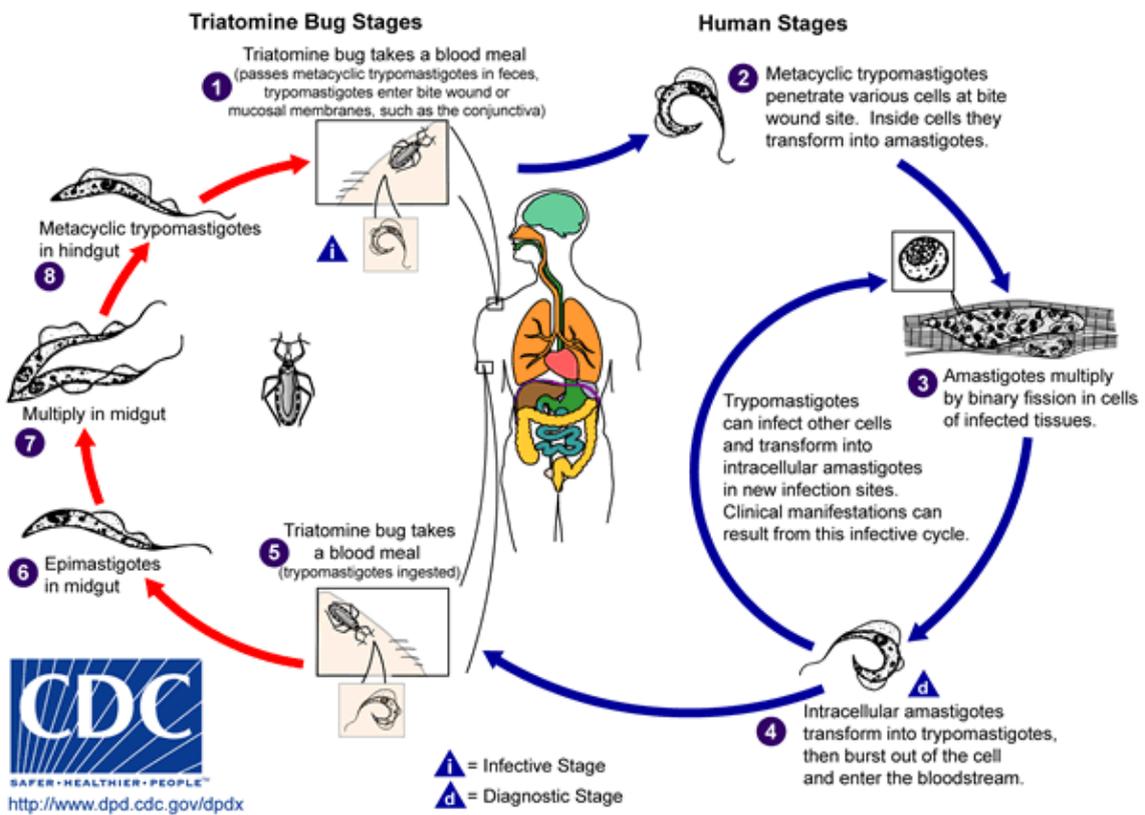
Como punto de referencia de la reacción, pueden procesarse simultáneamente un Control Positivo y un Control Negativo utilizándolos de la misma manera que la muestra.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA. Otras causas de resultados erróneos son: - Falta de acondicionamiento de la policubeta y los microdilutores (Ver RECOMENDACIONES PREVIAS).

- Policubetas rayadas por uso reiterado. No se aconseja reutilizar pocillos.
- Falta de homogeneización de los reactivos antes de su uso.
- Deficiencias de mezclado
- Vibraciones accidentales durante el reposo necesario para el desarrollo de la reacción.
- Sueros envejecidos o congelados y descongelados repetidamente.
- Contaminaciones accidentales de los reactivos o del material empleado en el ensayo.
- Exceso o defecto de Diluyente de Sueros HAI en los pocillos de la policubeta.
- Diluyente de Sueros HAI que tenga más de 5 días de preparación.
- No respetar los tiempos y temperaturas de incubación en el tratamiento con 2-ME al 1%.
- 2-Mercaptoetanol al 1% no preparado en el momento.

Anexo 4. Ciclo de vida del parasito



Anexo 5. Vectores



Rhodnius prolixus



Triatoma dimidiata

