

SALUD

SECRETARÍA DE SALUD



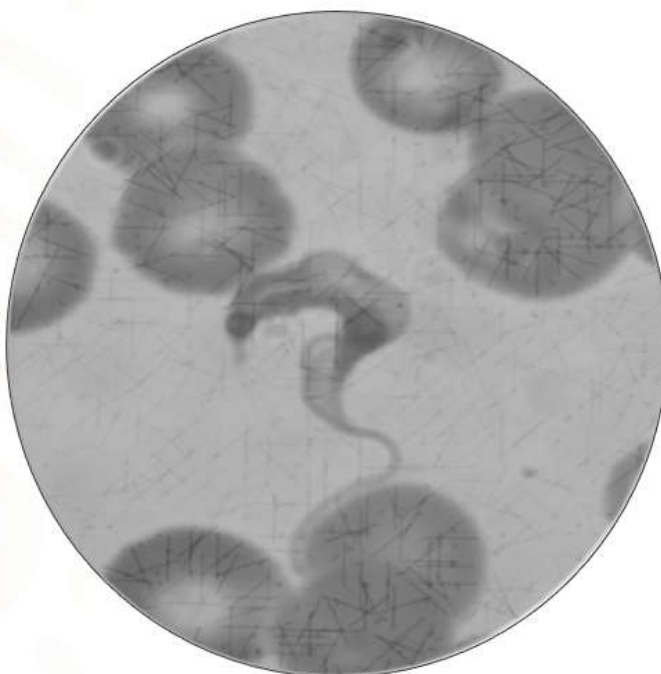
Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud

Dirección General de Epidemiología

Lineamientos de Vigilancia por Laboratorio

de la Enfermedad de Chagas

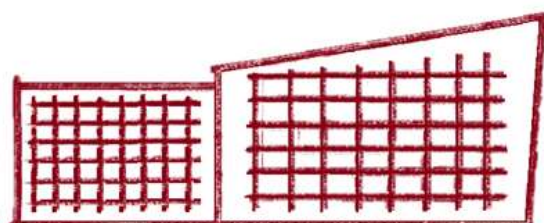
(Tripanosomiasis americana)



80

1939-2019
ISET-InDRE

InDRE



Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
"Dr. Manuel Martínez Báez"

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR
LABORATORIO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS
(TRIPANOSOMIASIS AMERICANA)

Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
“Dr. Manuel Martínez Báez”

2019

PRIMERA EDICIÓN. 2019

INDRE

TODOS LOS DERECHOS RESERVADOS CONFORME A LA LEY

© INDRE-SECRETARÍA DE SALUD

SE PERMITE LA REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL SI SE CITA LA FUENTE:
“INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS “DR. MANUEL MARTÍNEZ BÁEZ”. LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS, INDRE. MÉXICO: SECRETARÍA DE SALUD; 2019”

COLECCIÓN PUBLICACIONES TÉCNICAS DEL INDRE

INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS “DR. MANUEL MARTÍNEZ BÁEZ” FRANCISCO P MIRANDA 177, COL. LOMAS DE PLATEROS, DEL. ÁLVARO OBREGÓN, C. P. 01480, MÉXICO, D. F. WWW.INDRE.SALUD.GOB.MX TEL. (55)50-62-16-00

LA EDICIÓN ESTUVO A CARGO DE: DR. JOSÉ ALBERTO DÍAZ QUIÑÓNEZ

EL DISEÑO ESTUVO A CARGO DE: DR. JUAN FRANCISCO ROMÁN PEDROZA

IMPRESO EN MÉXICO. *PRINTED IN MEXICO*

PARA DUDAS SOBRE EL CONTENIDO DE ESTE LINEAMIENTO PONERSE EN CONTACTO juan.roman@salud.gob.mx Y CON LA COORDINACIÓN DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS A TRAVÉS DEL CORREO: sergio.pasten@salud.gob.mx Y CON EL ASUNTO: *CONTENIDO DE LINEAMIENTOS*

SECRETARÍA DE SALUD

Dr. Jorge Alcocer Varela

SECRETARIO DE SALUD

Dra. Asa Cristina Laurell

SUBSECRETARIA DE INTEGRACIÓN Y DESARROLLO DEL SECTOR SALUD

Dr. Hugo López-Gatell Ramírez

SUBSECRETARIO DE PREVENCIÓN Y PROMOCIÓN DE LA SALUD

Dr. José Luis Alomía Zegarra

DIRECTOR GENERAL DE EPIDEMIOLOGÍA

INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS
"DR. MANUEL MARTÍNEZ BÁEZ"
INDRE

Biól. Irma López Martínez

DIRECTORA DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA

Mtra. Lucía Hernández Rivas

DIRECTORA DE SERVICIOS Y APOYO TÉCNICO

Lic. Adriana Castro Cabrera

SUBDIRECTORA DE OPERACIÓN

Biól. Norma Angélica Montes Colima

JEFA DEL DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA

Mtra. Judith Estévez Ramírez

JEFA DEL DEPARTAMENTO DE CONTROL DE MUESTRAS Y SERVICIOS

Mtra. Mónica Salas García

JEFA DEL DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA

Dra. Gabriela Meneses Ruiz

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

GRUPO DE TRABAJO

BIOL. SERGIO PASTEN SÁNCHEZ

JEFE DEL LABORATORIO DE CHAGAS

COORDINADOR DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

QFB. MIGUEL ÁNGEL CASTRO ALANIS

QFB. MONTSERRAT LÓPEZ SERAFÍN

MVZ. NORMA ELENA ALVAREZ ORTÍZ

M EN C. EDGAR SALVADOR MARÍN SURU

ADSCRITOS AL LABORATORIO DE ENFERMEDAD DE CHAGAS

BIOL. IRMA LÓPEZ MARTÍNEZ

DIRECTORA DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA

DR. JOSÉ ALBERTO DÍAZ QUIÑÓNEZ

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	9
2. ANTECEDENTES	10
Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública	10
Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la Enfermedad de Chagas	11
3. MARCO LEGAL	12
4. DEFINICIONES OPERACIONALES	14
5. OBJETIVOS	15
Objetivo General	15
Objetivos Específicos	15
6. RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	16
Organización de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la enfermedad de Chagas	16
7. FUNCIONES DE LOS INTEGRANTES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	18
Funciones de los laboratorios a nivel local o jurisdiccional	18
Funciones de los Laboratorios Estatales de Salud Pública	18
Funciones del Laboratorio Nacional de Referencia	20
8. TOMA, MANEJO Y ENVÍO DE MUESTRA	21
Toma de muestra	21
Criterios de aceptación y rechazo	23
Envío y transporte	24
9. ALGORITMO DE DIAGNÓSTICO	25
10. CALIDAD EN EL SERVICIO DIAGNÓSTICO	41
11. PROGRAMA DE EVALUACIÓN EXTERNA DEL DESEMPEÑO	43
12. CRITERIOS PARA LA LIBERACIÓN DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS EN LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS PARA LA VIGILANCIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	46
13. BANCO DE MATERIAL BIOLÓGICO EN EL InDRE	47

14. BIBLIOGRAFÍA	48
15. ANEXOS	51
Anexo I: Características de los equipos comerciales	51
Anexo II: Sensibilidad y especificidad de los equipos probados por el InDRE	63

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, endémica en 21 países de América Latina, es causada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Este se transmite a humanos principalmente por las heces u orina de la chinche (insecto vector hematófago) o por transfusión sanguínea. Se calcula que en el mundo hay entre 6 y 7 millones de personas infectadas, primordialmente ubicados en América Latina. Esta enfermedad en la actualidad se ha propagado a otros continentes. La infección por *T. cruzi* puede ser eliminada si el tratamiento etiológico específico se administra al poco tiempo de producirse la infección.

En la fase crónica de la enfermedad, el tratamiento etiológico puede detener o prevenir la progresión de la enfermedad, de lo contrario hasta el 30% de los enfermos crónicos, presentan alteraciones cardíacas y un 10% padecen alteraciones digestivas, neurológicas o combinadas, estas manifestaciones requieren tratamiento específico.

En América Latina la práctica de mayor utilidad para prevenir la enfermedad de Chagas es el control vectorial. El tamizaje de la sangre previene la infección por vía transfusión sanguínea o trasplante de órganos. El diagnóstico de la infección en mujeres embarazadas, sus recién nacidos y hermanos es esencial para las estrategias de control. (WHO, 2016.)

En México, los triatóminos fueron reportados por primera vez en 1928 (Hoffman, 1928) y el primer caso humano fue descrito 12 años más tarde (Mazzotti, 1940). Se considera que nuestro país alberga una de las poblaciones de triatóminos más diversa, con 39 especies documentadas, al menos 21 de ellas infectadas por *T. cruzi*, lo que las convierte en vectores potenciales de la Enfermedad de Chagas.

La transmisión vectorial de *T. cruzi* se lleva a cabo en dos ecosistemas, uno relacionado con triatóminos selváticos y mamíferos silvestres (ciclo selvático), el otro asociado a la vivienda humana con la participación del vector que habita la vivienda o la peri domicilio en directa relación con animales domésticos y el hombre (ciclo doméstico) (Pinto-Dias, 1992).

El control y prevención de la enfermedad de Chagas depende de la información vigente sobre su magnitud, trascendencia, vulnerabilidad. En México el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) es un programa de acción conformado por un conjunto de estrategias y acciones que permiten identificar y detectar los daños y riesgos para la salud, su

importancia radica en la capacidad de generar información útil para la orientación del Programa de Enfermedades Transmitidas por Vector.

El presente documento establece los lineamientos de operación para la vigilancia basada en el laboratorio de la enfermedad de Chagas, incluyendo las funciones por niveles técnico- administrativos; la toma, manejo y envío de muestras; la metodología para el análisis de muestras (métodos convencionales y no convencionales) y la evaluación del desempeño, así como los estándares de calidad.

ANTECEDENTES

Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública

La Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP) es el conjunto de laboratorios con objetivos específicos que permiten unificar métodos de diagnóstico, criterios de interpretación de resultados, transferencia tecnológica, generación de conocimiento y formación de recursos humanos que garanticen procedimientos técnico-administrativos que produzcan información de laboratorio útil para la vigilancia epidemiológica y la operación de los programas preventivos.

Es el soporte técnico-científico útil para la vigilancia epidemiológica, genera información de calidad para la toma oportuna de decisiones, a través de la confirmación de diagnósticos mediante estudios de laboratorio en muestras biológicas.

La RNLSP está integrada por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez” (InDRE), como órgano rector de la red, los Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP) y los Laboratorios de Apoyo a la Vigilancia Epidemiológica (LAVE). Se encuentra estructurada en tres niveles: nacional, estatal y local o sus equivalentes para otras instituciones. El nivel nacional está representado por el InDRE como Laboratorio Nacional de Referencia (LNR).

Tiene fundamento legal en el reglamento Interior de la Secretaría de Salud y la Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, Para la vigilancia epidemiológica. Se encuentra definida en los Criterios de Operación para la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública Componente Vigilancia Epidemiológica. InDRE, 2015.

La Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública cuenta con el diagnóstico por laboratorio de la enfermedad de Chagas.

Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la Enfermedad de la enfermedad de Chagas

Los antecedentes del Laboratorio de Enfermedad de Chagas se remontan a la creación en 1939 del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales (ISET) en donde durante años se confirmaron los casos agudos de esta enfermedad. Estos eran detectados por microscopistas del Centro Nacional de la Erradicación del Paludismo (CNEP). El Laboratorio de Tripanosomátidos se crea en 1983 como parte del Departamento de Parasitología, y en ese año se inician estudios epidemiológicos sobre esta tripanosomiasis. En 1985 el laboratorio participó en las encuestas epidemiológicas en zonas rurales de varias entidades federativas y en otros estudios de seroprevalencia en bancos de sangre. En la década de los 80 también se promueve la creación del ceparios para *T. cruzi*.

En apoyo al diagnóstico de esta infección, se desarrollan técnicas serológicas utilizando preparaciones antigénicas propias y técnicas de inmunofluorescencia indirecta, tanto para Leishmaniosis como para Tripanosomiasis Americana, éstas fueron establecidas como metodologías de referencia.

En 1989, México recibió la transferencia de tecnología del Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatała Chabén”, Laboratorio de Referencia de la Organización Panamericana de la Salud (OPS)/OMS en Argentina, al Laboratorio de Tripanosomátidos del entonces Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE).

En los años de 1987-1990, el laboratorio participó en la *Encuesta Nacional Seroepidemiológica* que evidenció la distribución geográfica de la enfermedad y su prevalencia. En 1994 el Laboratorio de Tripanosomátidos fue dividido en los actuales Laboratorios de Enfermedad de Chagas y el de Leishmaniasis. Durante dicho periodo, también se impulsa el tamizaje de hemodonadores, se crea la Red Nacional de Laboratorios de Enfermedad de Chagas (RNLECh) que opera con el binomio Hemaglutinación Indirecta-Inmunofluorescencia Indirecta (HAI-IFI), pruebas para la detección de anticuerpos contra el *Trypanosoma cruzi*. En 1998 surge la necesidad de resolver la discordancia entre ambas pruebas y se implementa el Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

A inicios de este siglo, el actual Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez” (InDRE) cuenta con la suficiencia diagnóstica e implementa el algoritmo de referencia y control de calidad de la enfermedad de Chagas. Además, se establece un protocolo para la verificación de parámetros operativos de diagnóstico serológico utilizando los estuches comerciales disponibles en México. Con esta información se apoya a los Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP) en la correcta selección de reactivos. La técnica de Inmunoelectrotransferencia (*Western Blot*) se implementa en el año 2002 como apoyo al algoritmo de diagnóstico y referencia en casos particulares.

Tres años después, surge la necesidad de evaluar el desempeño de los integrantes de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP) y en 2005 inicia su participación en el Boletín Caminando a la Excelencia, como herramienta para identificar áreas de oportunidad en el desempeño de los LESP.

En 2008 se elaboran paneles de eficiencia siguiendo lineamientos estandarizados y se implementa el programa de evaluación externa del desempeño (PEED SEROCHAGAS) con dos ejercicios anuales. De 2008 a la fecha, se ha fortalecido el algoritmo de diagnóstico, con el uso de equipos comerciales de alto desempeño.

MARCO LEGAL

Constitución de los Estados Unidos Mexicanos

- Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos. Artículo 4. Diario Oficial de la Federación 05/II/1917, Última Reforma D.O.F. 27/01/2016.

Leyes

- Ley General de Salud, México. Nueva Ley publicada en el Diario Oficial de la Federación el 7 de febrero de 1984. Última reforma publicada DOF 16/02/2018.
- Ley Federal de Responsabilidades Administrativas de los Servidores Públicos. D.O.F. 16/07/2016.
- Ley General del Sistema Nacional Anticorrupción; 16/07/2016.
- Ley General de Protección de Datos Personales en Posesión de Sujetos Obligados. D.O.F. 26/01/2017.

Reglamentos

- Reglamento Interior de la Secretaría de Salud. México. D.O.F. 07/02/2018.
- Reglamento Sanitario Internacional (2005) 2da edición. Ginebra Suiza 2008. Organización Mundial de la Salud

Normas Oficiales Mexicanas

- Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, Para la vigilancia epidemiológica, D.O.F. 19/02/2013.
- Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2014, Para la vigilancia epidemiológica, promoción, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores.
- Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011. Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos.
- Norma Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos.
- Norma Oficial Mexicana NOM-035-SSA3-2012. En materia de información en salud
- Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005, que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos. D.O.F. 23/06/2006.
- Norma Oficial Mexicana NOM-018-STPS-2015, Sistema armonizado para la identificación y comunicación de peligros y riesgos por sustancias químicas peligrosas en los centros de trabajo. D.O.F. 09/10/2015

Planes y Programas

- Plan Nacional de Desarrollo 2019-2024.

Lineamientos y Manuales

- Dirección General de Epidemiología. Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Vector; DGAE. México: Secretaría de Salud; 2018.
- Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos "Dr. Manuel Martínez Báez. Criterios de Operación para la Red Nacional de

Laboratorios de Salud Pública Componente Vigilancia Epidemiológica; InDRE. México: Secretaría de Salud; 2019.

- Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez”. Lineamientos para la Gestión del Riesgo Biológico; InDRE. México: Secretaría de Salud; 2015.
- Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, “Dr. Manuel Martínez Báez”. Lineamientos para el reconocimiento a la competencia técnica de los laboratorios que apoyan a la vigilancia epidemiológica; InDRE. México: Secretaría de Salud; 2015.
- Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez”. Manual para la toma, manejo y envío de muestras para diagnóstico a la red nacional de laboratorios de salud pública, InDRE. México: Secretaría de Salud; InDRE. México: Secretaría de Salud; 2019.

DEFINICIONES OPERACIONALES

De acuerdo a las definiciones operacionales descritas en el Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia de las enfermedades transmitidas por vector, vigente, se definen los casos de la siguiente manera:

- **Caso probable:** Toda persona con presencia de fiebre y tenga al menos dos o más de los siguientes signos o síntomas: fatiga, dolor de cabeza, exantema, pérdida de apetito, diarrea, vómito, adenomegalia, hepatomegalia, esplenomegalia, inflamación local (chagoma), Signo de Romaña, miocardiopatía, miocarditis, cardiopatía dilatada, megaesófago o megacolon y que se identifique alguna asociación epidemiológica:
 - Presencia de vectores.
 - Antecedente de:
 - ✓ Visita o residencia en áreas de transmisión en las dos semanas previas al inicio del cuadro clínico.
 - ✓ Existencia de casos confirmados en la localidad.
 - ✓ Existencia de animales confirmados en la localidad.
 - ✓ Transfusión sanguínea o trasplante de persona seropositiva.
 - ✓ Hijo de madre seropositiva, reactiva a dos pruebas serológicas diferentes a *Trypanosoma cruzi*.

- o Bien, sea un caso doblemente reactivo a la misma prueba, mediante pruebas reconocidas por el InDRE.

La presencia de un caso probable de Tripanosomiasis Americana dará la pauta para la implementación de las actividades de prevención y control correspondientes.

- **Caso confirmado:** Todo caso probable en quien se demuestre, por técnicas directas o indirectas (mayor a 10 meses de edad) reconocidas por el InDRE, la presencia de *T. cruzi*.
- **Caso descartado:** Caso probable en el que no se encuentra evidencia, por técnicas directas o indirectas reconocidas por el InDRE, de *T. cruzi*.

OBJETIVOS

Objetivo General

Establecer y dar a conocer a la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la enfermedad de Chagas los procesos estandarizados de diagnóstico, control de calidad y referencia de las muestras, para un diagnóstico oportuno y de calidad, que garantice la exactitud diagnóstica de las pruebas para un agestión efectiva, segura y aporte positivo a la salud pública, seguridad del paciente y confiabilidad diagnóstica

Objetivos Específicos

- Garantizar la calidad del diagnóstico de la enfermedad de Chagas.
- Ser el documento guía para el soporte técnico-científico de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para el diagnóstico por laboratorio de la enfermedad de Chagas dentro del SiNaVE.

Ámbito de aplicación

El presente documento aplica a todos los laboratorios que forman parte de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la enfermedad de Chagas.

RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

El Laboratorio de Chagas del InDRE, como Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) a nivel federal, es responsable de la coordinación de la RNLSP para este diagnóstico, siendo el órgano rector de la Red para el diagnóstico, referencia, capacitación, actualización y evaluación de la competencia técnica.



Figura. 1. Distribución de los laboratorios integrantes de la RNLSP para el Diagnóstico Serológico de Chagas En color verde claro se presentan los estados que realizan dos pruebas, en verde oscuro tres pruebas, en rojo se indica los estados que no realizan el diagnóstico y en color ámbar en proceso de implementación.

Organización de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la enfermedad de Chagas

La red está constituida por tres niveles: federal, estatal y local:

- El nivel federal está representado por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE).

- El nivel estatal está constituido por los Laboratorios Estatales o Regionales de Salud Pública (LESP) que cuentan con las técnicas serológicas para el diagnóstico de la enfermedad.
- El nivel local está integrado por los laboratorios ubicados en centros de salud, hospitales o cabeceras jurisdiccionales.

En cada estado puede haber tantos laboratorios locales como sean necesarios para resolver las necesidades de diagnóstico en apoyo a la vigilancia epidemiológica y a las actividades de salud pública.

La coordinación de la RNLSP la ejerce el InDRE que interacciona con la RNLSP, quienes, a su vez, son los enlaces funcionales entre los laboratorios del nivel local y el de nivel nacional.

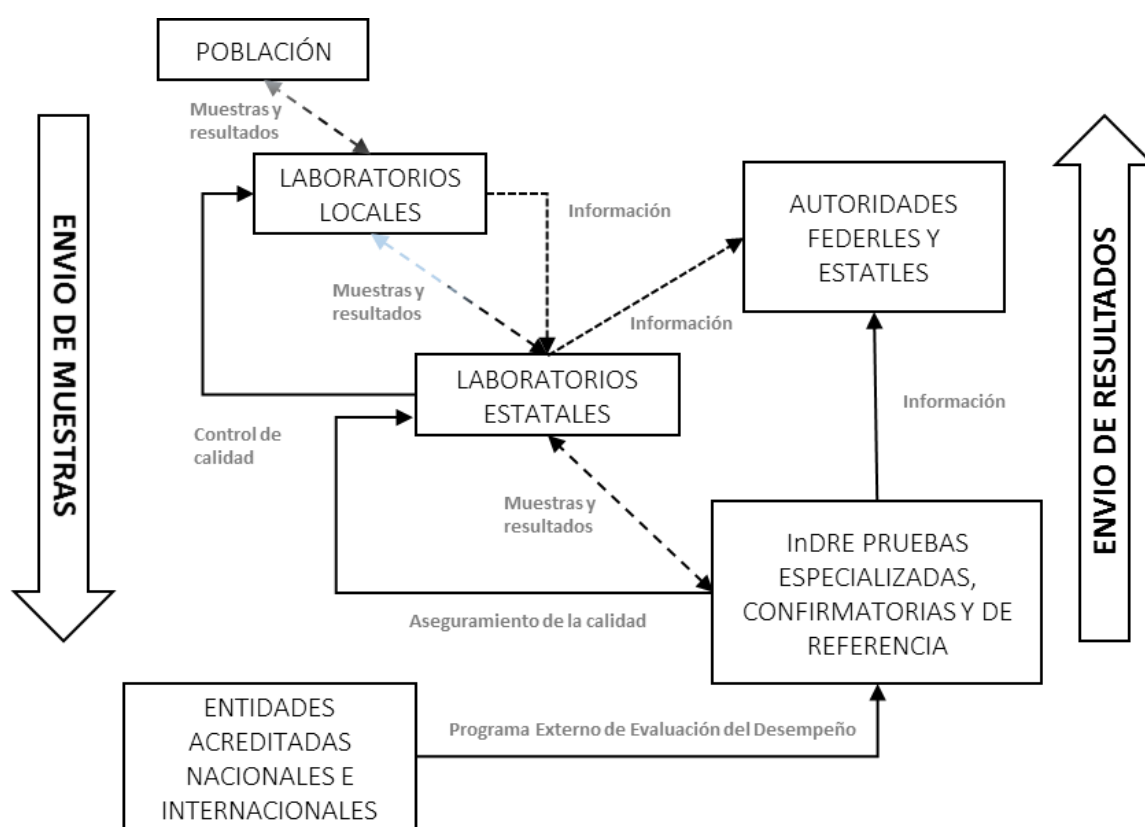


Figura. 2. Flujo de trabajo de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública

FUNCIONES DE LOS INTEGRANTES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Funciones de los laboratorios a nivel local o jurisdiccional

- Realizar alguna de las pruebas convencionales (HAI, ELISA e IFI), reconocida por el nivel estatal, para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas que requieren únicamente equipo básico de laboratorio.
- Referir muestras al LESP de su entidad para control de calidad y para la realización de las pruebas generales y especializadas o de referencia que no se realicen en el laboratorio local.
- Genera evidencia de la enfermedad de Chagas al notificar el resultado al solicitante del servicio los casos de enfermedad de Chagas confirmados: agudos, indeterminados y crónicos.
- Asistir a capacitación y asesoría del nivel estatal.
- Aplicar las recomendaciones del nivel estatal.
- Cumplir con el programa de control de calidad que establece el nivel estatal.

Funciones de los Laboratorios Estatales de Salud Pública

Para el diagnóstico

- Realizar actividades de vigilancia epidemiológica mediante pruebas de diagnóstico serológico con estuches comerciales reconocidos o metodología estandarizada previamente en el InDRE.
- Proporcionar a otras instituciones de salud formatos y lineamientos establecidos para la toma y envío de muestras al LESP, que garantice la cantidad y calidad de muestra que ingresa a la RNLSP.
- Enviar muestras al InDRE para la realización de pruebas generales, especializadas y de referencia.
- Generar evidencia de la enfermedad de Chagas al notificar al órgano normativo estatal correspondiente los casos agudos, indeterminados y crónicos confirmados

Para la evaluación del desempeño

- enviar al InDRE, para control de calidad y conformación del banco de sueros, el 100% de muestras positivas, el 10% de muestras negativas.
- Elaborar y llevar a cabo los programas operativos y de control de calidad en los laboratorios locales para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.
- Asegurar la validez y seguridad del diagnóstico, mediante la implementación de un programa de control de calidad interno en el día a día y la participación en un programa de control de calidad externo a través de paneles de eficiencia, dos veces por año (PEED SEROCHAGAS).

Para la capacitación

- Desarrollar, promover y apoyar acciones de capacitación e investigación para el mejoramiento a los integrantes de la red estatal de laboratorios para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.
- Brindar supervisión y asesoría al personal de los laboratorios a nivel local.

Para el apoyo técnico

- Promover la utilización adecuada de las pruebas de diagnóstico y la interpretación de resultados por medio de capacitación realizada en cursos-taller, impartidos por personal del LESP con el compromiso de que la capacitación sea dinámica y de acuerdo a las tendencias y necesidades de la RNLSP
- Participar en la elaboración y actualización de manuales técnicos referentes a diagnóstico y temas especializados (bioseguridad, manejo de residuos peligrosos biológico-infecciosos, etc.) para uso en el ámbito estatal y local.

Funciones del Laboratorio Nacional de Referencia

El laboratorio de Enfermedad de Chagas del InDRE es el Laboratorio Nacional de Referencia para los laboratorios de la RNLSP y el órgano normativo para su diagnóstico; sus funciones son:

- Efectuar el diagnóstico serológico y parasitológico de la Enfermedad de Chagas.
- Consolidar los algoritmos de referencia y criterios de interpretación de resultados.
- Realizar las pruebas de control de calidad en el diagnóstico parasitológico y serológico, apoyado a nivel estatal, por los LESP.
- Transferir métodos de diagnóstico estandarizados y validados a los laboratorios integrantes de la Red.
- Ofrecer biológicos como, antígeno IFI y sueros control, aplicando las cuotas de recuperación de acuerdo al tabulador vigente.
- Verificar las características operativas de estuches comerciales como apoyo a la RNLSP en la selección de reactivos.
- Preparar y enviar paneles de eficiencia (PEED SEROCHAGAS) a los LESP participantes.
- Capacitación continua en servicio para la formación o actualización de recursos humanos en la prestación de un servicio eficiente.
- Implementar y adecuar nuevas técnicas de diagnóstico en apoyo al algoritmo de referencia.
- Desarrollar investigación aplicada en apoyo a la vigilancia epidemiológica.
- Generar información de orden nacional, integrando y como el rector de la RNLSP, en materia de diagnóstico, investigación y desarrollo tecnológico para la vigilancia epidemiológica para la toma de decisiones en el control de la enfermedad que incidan en la formulación y orientación del programa nacional de salud.

TOMA, MANEJO Y ENVÍO DE MUESTRA

Precauciones universales

Todas las muestras para diagnóstico, confirmación o investigación en eventos de interés en salud pública serán consideradas potencialmente infecciosas, por lo que siempre se deben seguir las medidas de prevención de riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos, así como las recomendaciones del Manual de bioseguridad en el laboratorio de la Organización Mundial de la Salud (Ginebra, 2005).

Una muestra adecuada se define como la muestra representativa consistente con el estado clínico a investigar, en cantidad suficiente, colocada en un envase adecuado, identificada, conservada y transportada correctamente.

Recolección de la muestra

El procedimiento para la toma de muestra sanguínea está descrito en la OMS/SIGN: Carpeta de material sobre seguridad de las inyecciones y los procedimientos conexos de la Organización Mundial de la Salud, 2011; así como en las directrices de la OMS sobre la extracción de sangre: las mejores prácticas en la flebotomía (WHO guidelines on drawing blood: best practices in phlebotomy. Organización Mundial de la Salud, 2010). Siguiendo las especificaciones de los *Lineamientos para la toma, manejo y envío de muestras para diagnóstico a la RNLSP*.

La muestra enviada al laboratorio estatal (LESP) o al InDRE:

- Debe ser la muestra primaria o una fracción de ella,
- Nunca se debe enviar la muestra de trabajo utilizada para el diagnóstico en el laboratorio.
- No se debe enviar muestras en envases de vidrio.
- El envase o vial debe tener cierre hermético, no utilizar cinta adhesiva en tapones.

Tabla 1. Toma y manejo de muestras clínicas

A. Técnicas parasitológicas

Tipo de muestra	Método	Medio/contenedor/forma de envío	Tiempo	Técnica
Sangre capilar	Por punción digital	Extendido sobre porta objetos si es posible coloreado con Giemsa, muestra de sangre en laminilla a TA	Durante la fase aguda de la enfermedad	Frotis, Gota gruesa
Sangre total	Por venopunción en tubos con heparina/EDTA	2.0 mL, enviar con refrigerantes de 4 a 8 °C	Durante la fase aguda de la enfermedad	Frotis, Gota gruesa
Sangre total	Por venopunción en tubos con heparina/EDTA	2.0 mL, enviar con refrigerantes de 4 a 8 °C	Durante la fase aguda de la enfermedad	Micrométodo en tubo capilar o Microstrout

B. Técnicas serológicas: determinación IgG anti *T. cruzi*

Tipo de muestra	Método	Medio/contenedor/forma de envío	Tiempo	Técnica
Suero	Por venopunción en tubos sin anticoagulante	1.0 mL, enviar con refrigerantes de 4 a 8 °C	Durante la fase aguda (al menos 28 días después de iniciada la fase aguda) y crónica de la enfermedad	ELISA Ag totales ELISA Ag recombinantes IFI Parásito integro HAI Ag totales

Nota: Para recién nacidos las muestras, para micrométodos y serología, deben ser obtenidas a la par.

La correcta identificación de cada muestra es imprescindible, cada una de ellas debe estar rotulada en forma completa con los siguientes datos:

- Apellido y nombre
- Sexo y Edad

- Fecha de la toma de la muestra
- Datos necesarios según el caso

La muestra de suero, sangre o laminilla (ver cuadro 1A y 1B) debe acompañarse del formato único para el envío de muestras biológicas y del formato de estudio de caso si aplica o del resumen de historia clínica y de la solicitud del estudio.

Criterios de aceptación y rechazo

Criterios de aceptación

- La muestra de sangre total para el aislamiento, frotis, gota gruesa o micrométodos, en volumen apropiado, deberá acompañarse del formato F-REM-01 y/o del resumen de historia clínica y oficio de la solicitud del estudio. Para laminillas (Frotis o gota gruesa) el requisito es el mismo.
- La falta de alguno de estos documentos causa rechazo, la muestra quedará en resguardo, se notificará al usuario vía correo electrónico y posteriormente por paquetería, contará con un periodo de siete días naturales para enviar la documentación complementaria, de no ocurrir se rechazará definitivamente.
- La muestra no deberá estar contaminada o contener alguna sustancia interferente. Si sucede, la muestra será rechazada de manera definitiva y se notificará oportunamente al usuario o responsable del envío por correo electrónico.
- La laminilla (frotis o gota gruesa) deberá venir rotulada y no deberá estar rota, si sucede, será rechazada y se notificará oportunamente al usuario o responsable del envío vía correo electrónico.
- El diagnóstico parasitológico de la tripanosomiasis americana seguirá el algoritmo. Para el aislamiento los resultados serán emitidos 90 días después de recibida la muestra, para micrométodos, frotis y gota gruesa los resultados serán emitidos 24 horas después de recibida la muestra, diagnóstico caso agudo.
- En casos especiales si la muestra no cumple con los criterios de calidad y cantidad, pero el usuario considera que la muestra es de alto valor deberá notificarlo al Laboratorio de Enfermedad de Chagas por escrito en la solicitud o formato.

Criterios de Rechazo:

- La falta de alguno de estos documentos o inconsistencia en la identificación precisa de la muestra será causa de rechazo y se le notificará al usuario. La muestra quedará en resguardo en el laboratorio y contará con un periodo de siete días naturales para enviar la documentación completa o corrección, de no ser así la muestra será desechada.
- La muestra será rechazada de manera definitiva si está hemolizada, contaminada, lipémica o contener alguna sustancia interferente, y se notificará al usuario o responsable del envío, vía correo electrónico.
- El diagnóstico serológico de la tripanosomiasis americana seguirá el algoritmo. Los resultados serán emitidos para diagnóstico en 10 días, para referencia y control de calidad 15 días después de recibida la muestra.

Muestras de alto valor

Es aquella que se recibe en el laboratorio y que no cumple con alguno de los criterios de aceptación pero que por las características de evolución (hospitalización, alta, mejoría o defunción) del paciente se considera una muestra de alto valor epidemiológico. Por tal motivo el laboratorio de procesamiento cuenta con la atribución de no rechazar o procesar la muestra.

El laboratorio se debe asegurar que en el informe de resultados se indique la naturaleza del problema y se especifique que se requiere precaución cuando se interprete el resultado. El proceso de estas muestras se especificará en el apartado de observaciones.

Envío y transporte

El envío de muestras debe realizarse a la brevedad posible después de la obtención de la muestra y en no más de siete días hábiles. El tubo con la muestra de suero se empaqueta bien en un recipiente con doble cubierta y en un contenedor que cierre herméticamente y se envía de inmediato. Se debe proteger de la luz solar y del calor excesivo con un refrigerante (4-8 °C), siguiendo las instrucciones del triple embalaje básico, que no debe de estar en

contacto directo con la muestra. En el caso de las dependencias de la Secretaría de Salud la muestra se envía al Laboratorio Estatal de Salud Pública correspondiente.

Para otras instituciones el envío se realizará de conformidad con los acuerdos estatales al interior del Comité Estatal de vigilancia Epidemiológica.

ALGORITMO DE DIAGNÓSTICO

La enfermedad de Chagas en su evolución natural se divide en fase aguda y fase crónica asintomática y sintomática, en cada fase, la presentación clínica, los criterios diagnósticos y terapéuticos son distintos.

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas se basa en la evaluación clínica, epidemiología y pruebas de laboratorio. Para el diagnóstico por laboratorio, las selecciones adecuadas de la prueba dependen de la fase clínica del paciente. En la fase aguda los estudios se centran en la búsqueda y reconocimiento del *T. cruzi* en sangre (abordaje parasitológico), ya que en las etapas iniciales de la enfermedad se halla parasitemia importante y a medida que transcurre su evolución van disminuyendo hasta hacerse inaparente. En la fase crónica (asintomática o sintomática) las parasitemias son transitorias y por ello el diagnóstico se realiza mediante la búsqueda de anticuerpos circulantes contra el *T. cruzi*. (abordaje serológico)

1. Diagnóstico serológico

El diagnóstico serológico es un método indirecto y se basa en la detección de anticuerpos específicos contra *T. cruzi*, por tanto, sus resultados nunca aportarán certeza diagnóstica y se deben evaluar en términos de probabilidad. Para que la probabilidad se aproxime a la certeza, es importante seleccionar adecuadamente la prueba, el tipo y momento de la toma de muestra y la interpretación apropiada de los resultados.

El diagnóstico por laboratorio se realiza en una muestra de sangre, suero o plasma del paciente, el tipo de prueba y muestra a utilizar se determina con base en la fase en la que se encuentra la enfermedad. Se debe obtener una muestra de sangre completa por venopunción, aproximadamente 5mL en un tubo con o sin anticoagulante, en congruencia con el tipo de prueba a utilizar.

El abordaje serológico generalmente utiliza suero o plasma. La muestra de suero o plasma debe mantenerse siempre en refrigeración (2-8 °C) desde la toma hasta la llegada al LESP o InDRE. La muestra deberá venir acompañada con el Formato de envío debidamente completado, con letra legible, sin datos alterados o sobre escritos y en caso de considerarlo conveniente indique la gravedad del paciente; las muestras que no cumplan con los requisitos ya establecidos, serán rechazadas.

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2014. Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector, el diagnóstico de la enfermedad de Chagas se basa en el cuadro clínico asociado a la fase aguda o a la fase crónica con síntomas o asintomática del padecimiento, así como en pruebas parasitológicas y serológicas. En fase aguda, el diagnóstico se confirma al demostrar la presencia del *Trypanosoma cruzi* por estudio directo, por técnicas de concentración, cultivo o sub inóculo de sangre y/o por serología positiva a partir de las 4 semanas de infección. En fase crónica, con o sin síntomas, se confirma el diagnóstico clínico principalmente por serología positiva.

La confirmación del diagnóstico clínico presuntivo se establece ya sea por la demostración del parásito o bien por al menos 2 pruebas serológicas de diferente formato y con resultado positivo. El Control de calidad del diagnóstico, parasitológico como el serológico se debe realizar según se indica en el apartado correspondiente.

La confirmación del diagnóstico por laboratorio se establece por la demostración del parásito o bien por al menos dos pruebas serológicas de diferente formato con resultado positivo. Los servicios de salud instalados en áreas endémicas, donde la población está en riesgo de contraer la parasitosis, deben contar con la información necesaria para establecer el diagnóstico clínico, parasitológico y serológico. Los criterios de laboratorio para la clasificación de casos son de acuerdo al cuadro 2.

Tabla 2. El diagnóstico de la enfermedad de Chagas se realiza por criterios clínico, epidemiológicos y principalmente con ayuda de métodos parasitológicos o serológicos

Parásitos cualquier método	Serología dos pruebas	Sintomatología	Criterio diagnóstico de caso
+	+	+	Agudo
+	-	+	Agudo
-	+	+	Agudo
+	+	-	Indeterminado
-	+	-	Indeterminado
-	+	+	Crónico
-	-	+	No caso

El diagnóstico serológico de la infección por *T. cruzi* involucra una mezcla de anticuerpos dirigidos contra antígenos de parásito a diferente concentración, afinidad y tiempo de aparición. Puede haber expresión de diferentes mosaicos antigénicos entre las distintas cepas y reactividad cruzada con microorganismos relacionados que comparten zonas geográficas. Los distintos métodos y estuches de reactivos para el diagnóstico pueden comportarse de manera diferente frente a una misma muestra y la evaluación de desempeño de diferentes lotes no son siempre consistentes con estudios previos.

La especificidad del diagnóstico serológico para la tripanosomiasis americana es buena, sin embargo, la sensibilidad es mayor hacia la fase crónica sintomática. Los antígenos en los estuches comerciales o reactivos de preparación local son obtenidos a partir de diferentes cepas y fases del parásito, van desde el parásito íntegro, extractos crudos, extractos parcialmente purificados, antígenos recombinantes de fase aguda o crónica, péptidos sintéticos, hasta antígenos quiméricos. Los estuches de diagnóstico son muy variables en su composición antigénica y ninguno de ellos alcanzan por sí solo el 100% de certeza diagnóstica (WHO, 2010), es por esto que, los grupos de expertos internacionales de Tropical Disease Research (TDR)/World Health Organization (WHO) (TDR-WHO) recomiendan para tamiz, una prueba altamente sensible y para diagnóstico realizar al menos dos pruebas simultáneas (diseño en paralelo), de diferente composición antigénica. Con este diseño, el diagnóstico, puede alcanzar un rango de sensibilidad del 98-99.5%. Sin embargo, una limitante es la presencia de resultados discrepantes en el par serológico, la frecuencia de estos es dependiente de las características del desempeño de las pruebas utilizadas. La selección de las pruebas de diagnóstico depende de:

- la relación costo/beneficio
- el formato, al tipo de antígenos y sistema de detección.

Algunas metodologías utilizan conjugados polivalentes (Anti IgM, IgG e IgA) con el propósito de incrementar su aplicabilidad al espectro de la enfermedad, sin embargo, puede haber un incremento de la tasa de falsos positivos. La experiencia en Sudamérica y México señala que el mejor par serológico utilizadas en un diseño en paralelo es un ELISA confeccionado con antígenos crudos, más otro ELISA con antígenos recombinantes.

Las técnicas de biología molecular han mostrado una variabilidad importante y a la fecha sólo son de utilidad en casos particulares. Se debe tener en cuenta que los valores predictivos; positivos o negativos, varían en función de la prevalencia de la infección.

El 30.5% de laboratorios de la RNLSP utilizan antígenos recombinantes (formato ELISA), 62.7% antígenos crudos (37.2% formato ELISA y 25.5% formato HAI), 2.7% parásito íntegro (formato IFI) y el 4% analizador automatizado (quimioluminiscencia). El equipo básico para realizar estas técnicas depende del formato seleccionado y en general es: un lector de ELISA con un filtro de 450nm y otro de referencia entre 600-650nm, un lavador para placas de ELISA, una incubadora placas de ELISA, un microscopio de epifluorescencia y micropipetas multicanal y unicanal de volumen variable, además del material requerido especificado en el inserto, pero no incluido en los estuches de diagnóstico.

Los procedimientos se deben realizar siguiendo las indicaciones del inserto del estuche de diagnóstico. Se debe utilizar diariamente suero independiente al estuche, de baja reactividad, para monitorear el comportamiento de las pruebas realizadas (valida las reacciones y detectar alteraciones lote a lote). Cabe señalar que, para el inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas, no existe una técnica de referencia.

El algoritmo de referencia del InDRE para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, proviene de la modelación como árbol de decisión, en donde las muestras ingresadas tienen una probabilidad *a priori* de ser reactivas o no, que depende del servicio solicitado, es decir en una muestra referida para control de calidad se espera mayor certeza diagnóstica, ya que la probabilidad *a priori* de ser reactiva es mayor que en una muestra que es referida para diagnóstico o referencia y es bajo esa condición que se desarrolló el algoritmo. Para lo cual fue necesario considerar los métodos a utilizar, el orden de realización (diseño en paralelo), el momento de la toma de muestra y la interpretación apropiada de los resultados.

Los métodos reconocidos son:

Métodos convencionales

- ELISA

Método	Fracciones antigénicas
ELISA	Ag purificados
ELISA	Ag crudo

y convencionales mejorados

Método	Fracciones antigénicas
ELISA	CRA + FRA
ELISA Ag rec	Ag1, Ag2, Ag30, SAPA, Ag13 y Ag36
ELISA	TcD, TcE, PEP-2 y TcLo1.2 (multiepitope)
ELISA PS	B13, 1F8 y H49

- Hemaglutinación indirecta (HAI)
- Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Los parámetros operativos para establecer la validez y seguridad del método son:

- Sensibilidad (S)
- Especificidad (E)
- Valor predictivo Positivo (VPP)
- Valor Predictivo Negativo (VPN)

Estos últimos (VPP y VPN) se ven afectados por la prevalencia de la infección.

Los laboratorios de la RNLSLSP deben tener disponibles al menos dos pruebas de diagnóstico de diferente composición antigénica. Estas pruebas son seleccionadas de acuerdo a la complejidad del laboratorio, su infraestructura y la formación profesional de su personal operativo.

La ejecución de dos pruebas serológicas no garantiza un resultado definitivo, ya que se pueden presentar algunas situaciones que es necesario conocer y resolver. El valor de corte, es el punto C en la escala de medición (densidad óptica o razón S/Co ; en donde S es la densidad óptica de la muestra estudiada y Co es el valor de corte), valores mayores o iguales se informa como positivo y menores se informa como negativo, este valor da un sentido simple y práctico para interpretar el resultado: el valor Y_i etiqueta al individuo como libre de la enfermedad si $Y_i < Co$ y con la enfermedad si $Y_i > Co$. Sin embargo, esta regla de decisión presenta una región C5-C95 (zona gris o incertidumbre), en la que los valores no determinan si es positivo o no y se reportan como no concluyente (resultado indeterminado). La zona de incertidumbre se determina en absorbancia como $Co \pm 10\%$, y de 0.9 a 1.1 para la razón S/Co . Estos valores están descritos en el inserto del equipo de diagnóstico utilizado, en caso que no lo cite el inserto se debe determinar esta región de incertidumbre como medida de seguridad al paciente.

Las pruebas rápidas son una herramienta para la detección de anticuerpos anti-*T.cruzi* mediante inmunocromatografía de flujo lateral. Las pruebas existentes en el mercado tienen parámetros de especificidad y sensibilidad determinada por su diseño. Estas pruebas se recomiendan como métodos de tamizaje por su costo y fácil uso en estudios poblacionales o encuestas seroepidemiológicas.

Ejemplo de situaciones especiales sería: Algoritmo de dos pruebas (par serológico en paralelo), resultados esperados y su interpretación

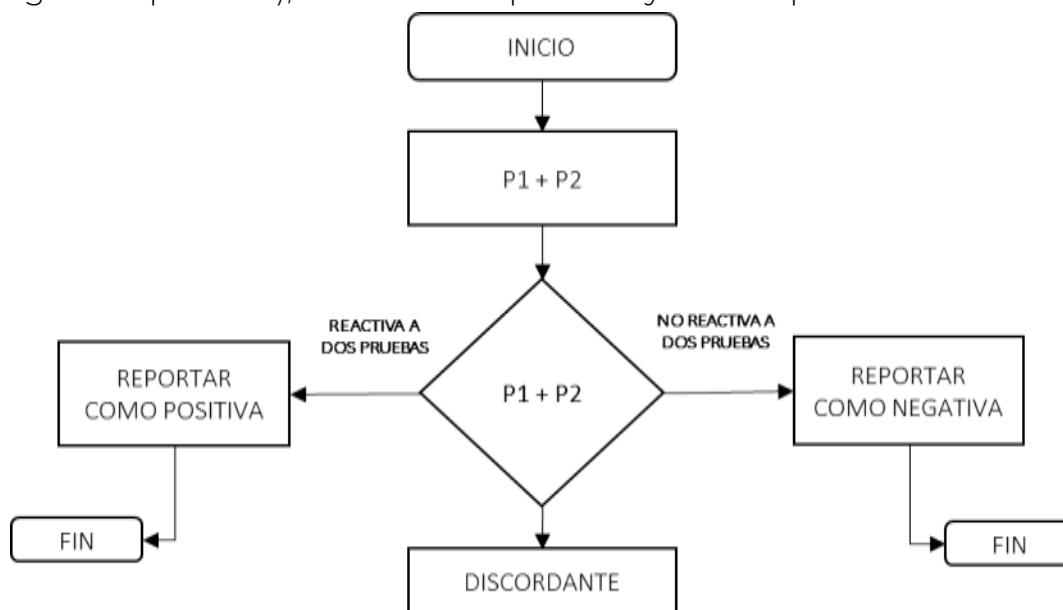


Figura 3. Algoritmo de dos pruebas (par serológico en paralelo), resultados esperados y su interpretación. Determinación de anticuerpos séricos anti *Trypanosoma cruzi* (al menos dos pruebas diferente formato: HAI, IFI, ELISA y WB) Clave: 1D2612006

Nota: P1 (prueba 1) se debe utilizar prueba con alta sensibilidad (antígenos totales o parcialmente purificados), P2 (prueba 2) se debe utilizar prueba con alta especificidad (antígenos recombinantes).

Situación a: caso discordante:

Decisión en el laboratorio:

- Repetir la prueba con la misma muestra.
- Enviar a Laboratorio de Referencia (LR).
- Pedir una nueva muestra, en mes y medio.

Acciones Esenciales para la Seguridad del Paciente; Recomendación al médico

- No considerar como infectado.
- Explicar al paciente que las pruebas de laboratorio tienen limitaciones y hay que evaluar con base a la clínica y la epidemiología.

Situación b: caso no concluyente (zona de incertidumbre)

Los valores de densidad óptica en la zona de incertidumbre (punto de corte $\pm 10\%$ ó 0.9 a 1.1 razón S/Co), el resultado no debe calificarse como positivo o negativo, se debe reportar como no concluyente.

Decisión en el laboratorio:

- Repetir la prueba con la misma muestra.
- Enviar al Laboratorio de referencia (LR).
- Solicitar nueva muestra, en tres semanas.

Acciones Esenciales para la Seguridad del Paciente; Recomendación al médico

- No considerar como positivo o negativo.
- Explicar al paciente que las pruebas de laboratorio tienen limitaciones analíticas.

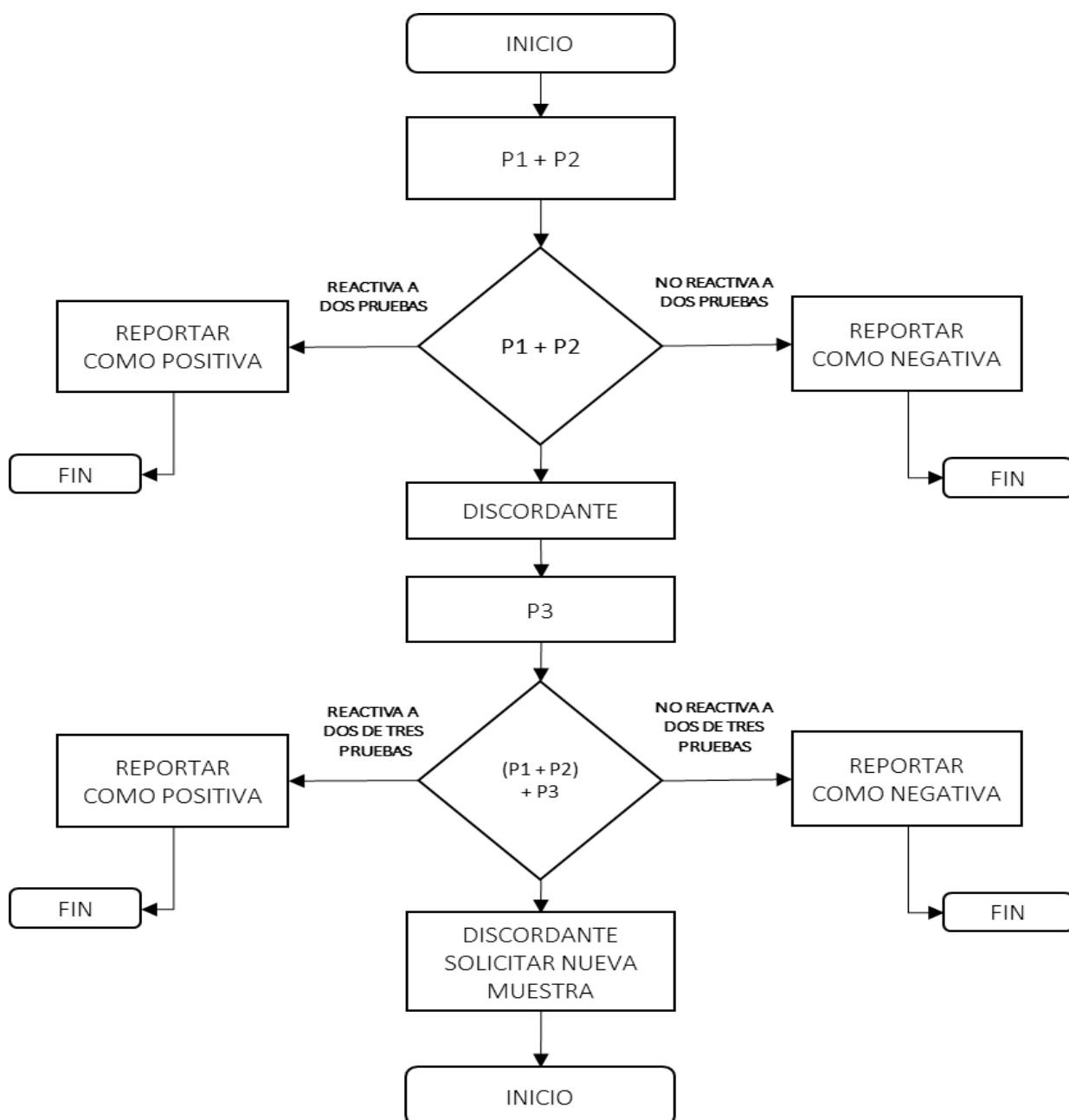


Figura 4. Algoritmo de tres pruebas, interpretación en paralelo, resultados esperados y su interpretación, P1 prueba 1, P2 prueba 2, P3 prueba 3. Determinación de anticuerpos séricos anti *Trypanosoma cruzi* (al menos dos pruebas diferente formato: HAI, IFI, ELISA y WB) Clave: 1D2612006

Nota: P1 prueba 1, se recomienda utilizar prueba con alta sensibilidad (antígenos totales), P2 prueba 2, se recomienda utilizar prueba alta especificidad (antígenos recombinantes). P3. Se recomienda utilizar prueba con alta especificidad.

Situación c: caso no concluyente (dos pruebas con resultado dudoso)

La presencia de un resultado dudoso en la prueba realizada, por ejemplo, en ELISA valores de densidad óptica en la zona de incertidumbre (punto de corte $\pm 10\%$ ó 0.9 a 1.1 razón S/Co), o una imagen dudosa en hemaglutinación o un patrón de fluorescencia dudoso en IFI, etc. El resultado no debe calificarse como positivo o negativo, se debe reportar como no concluyente.

Decisión en el laboratorio:

- Repetir la prueba con la misma muestra.
- Enviar al Laboratorio de referencia (LR).
- Solicitar nueva muestra, en tres semanas.

Recomendación al médico:

- No considerar como positivo o negativo.
- Explicar al paciente que las pruebas de laboratorio tienen limitaciones analíticas.

2. Diagnóstico parasitológico

El laboratorio es determinante en el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas, sin embargo, este diagnóstico debe integrar los datos clínicos, y epidemiológicos. Existen tres aspectos que deben ser considerados al realizar el diagnóstico por laboratorio:

- ¿Qué tipo de prueba? Para búsqueda de parásito o de anticuerpos.
- ¿Cuándo realizarla? En fase aguda o crónica
- ¿Cuál es el objetivo de la prueba? Confirmar, descartar o descubrir

La demostración de *T. cruzi*, es el diagnóstico indiscutible de infección chagásica pero sólo se recomienda practicarlo en la fase aguda, después de 7 a 15 días (periodo de ventana) en donde las técnicas parasitológicas presentan

una sensibilidad al menos del 95% en la fase aguda, disminuyendo hasta un 50% al evolucionar a la fase crónica.

Como en otras enfermedades infecciosas, se presenta un periodo de ventana que es necesario conocer para evitar la utilización de métodos de diagnóstico en momentos inadecuados y obtener resultados falsos negativos.

Los métodos de elección para la detección del parásito durante la fase aguda son aquellos que requieren procesos de al menos 3 horas.

El hemocultivo y la utilización de animales de experimentación solo se recomiendan para confirmar la presencia del parásito en las fases crónica asintomática y sintomática, o para fines de investigación.

Tabla 3. Ventajas y desventajas de las técnicas de diagnóstico, parasitológico de la enfermedad de Chagas

Técnica	Ventajas	Desventajas
1.- Frotis sanguíneo 2.- Gota gruesa	1. Resultado rápido 2. Certeza diagnóstica 3. Simplicidad operativa 4. Bajo costo	Sensibilidad cercana al 60% en el período agudo y 10% en el período crónico
1.- Micrométodos	1. Elevada sensibilidad 2. Certeza diagnóstica 3. Facilidad en la obtención de la muestra 4. Bajo costo	Sensibilidad de 90% a 100% en el período agudo, no valorada en crónico
4.- Hemocultivo	1. Elevada sensibilidad 2. Certeza diagnóstica 3. Facilidad en la obtención de la muestra 4. Bajo costo	1. Sensibilidad de 90% a 100% en el período agudo, en crónico 20-50% 2. Requiere experiencia del operador. Contaminaciones por hongos o bacterias

5.- Modelo experimental (inoculación en ratón)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Elevada sensibilidad 2. Certeza diagnóstica 3. Facilidad en la obtención de la muestra 4. Se incrementa costo 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sensibilidad de 90% a 100% en el período agudo, en crónico 20-50% 2. Requiere experiencia del operador 3. Infraestructura compleja, bioterio, gabinetes de bioseguridad, etc.
---	---	--

Los métodos parasitológicos convencionales permiten detectar al parásito, y consecuentemente efectuar el diagnóstico de certeza, prácticamente en el 95% de los casos durante el período agudo.

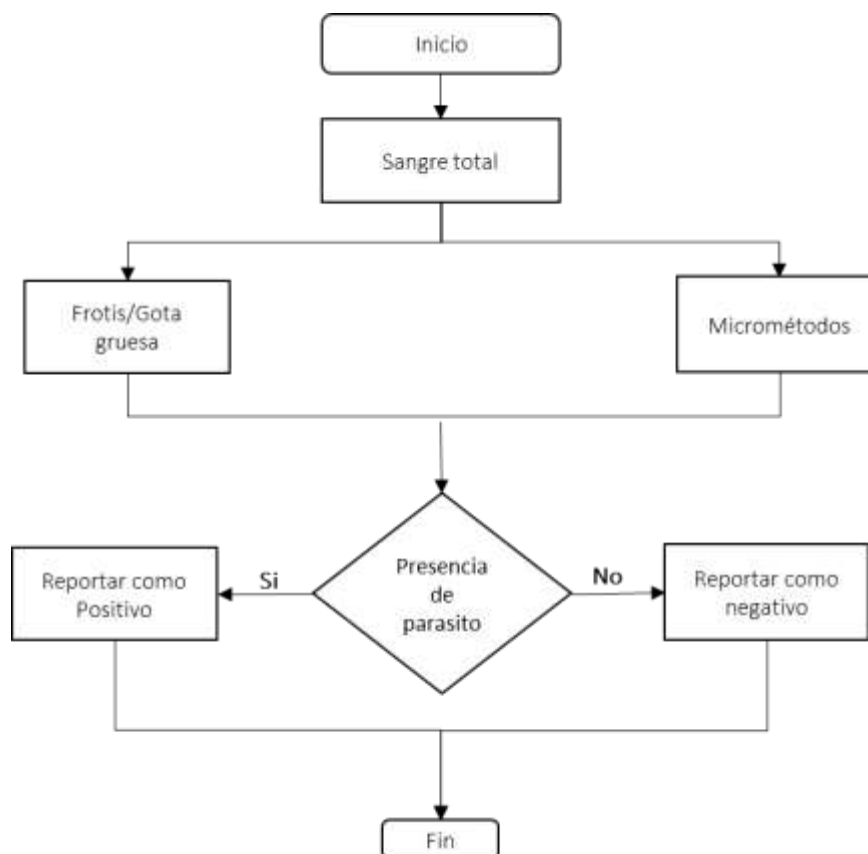


Figura. 5. Algoritmo diagnóstico parasitológico fase aguda. Identificación morfológica de *Trypanosoma cruzi* en muestras de sangre. Clave: 1D2612002 e Identificación rápida en sangre de *Trypanosoma cruzi* (microhematocrito). Clave: 1D2612001

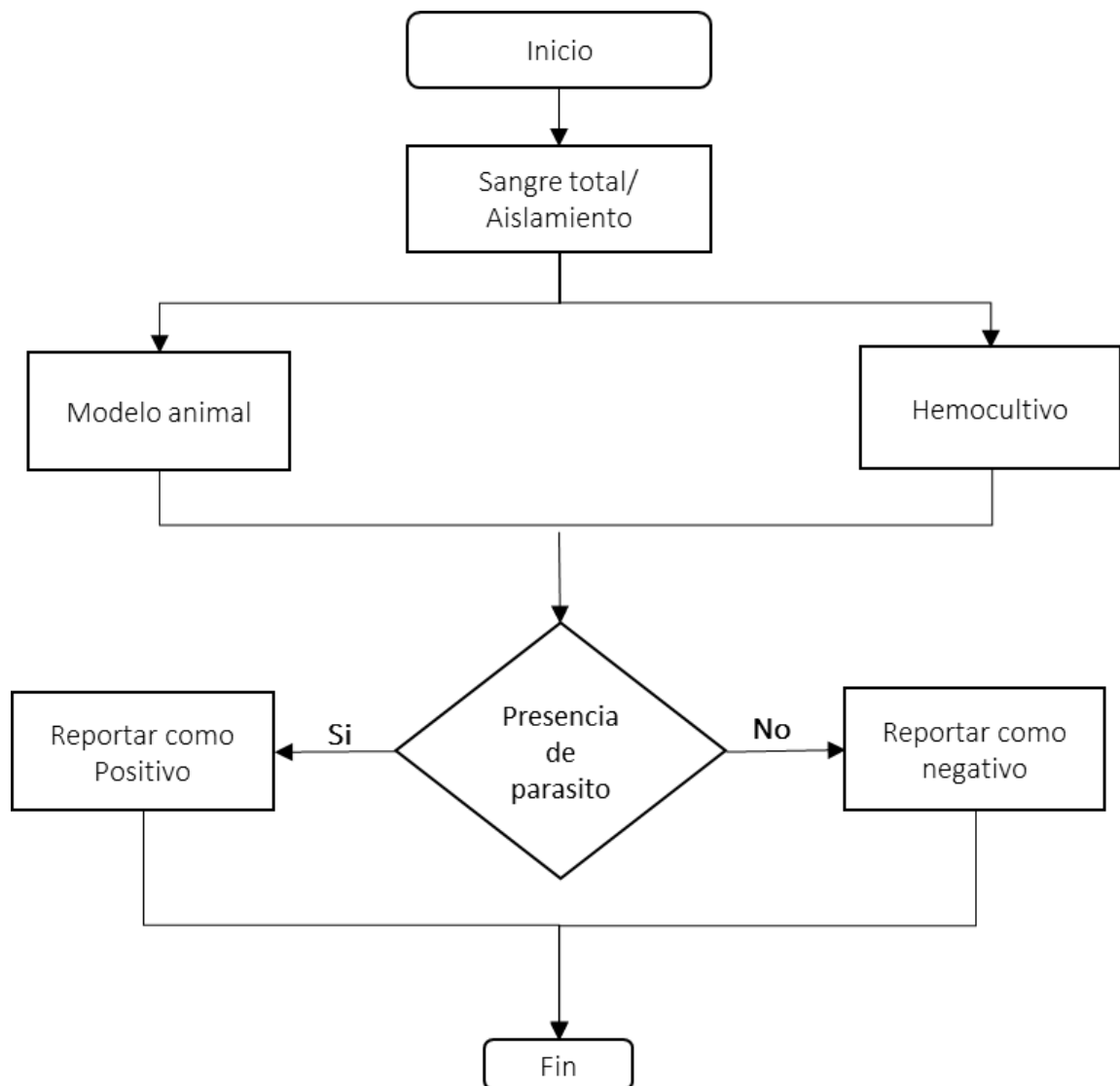


Figura. 6. Algoritmo diagnóstico parasitológico fase crónica. Aislamiento de *Trypanosoma cruzi* a partir de muestras de sangre (inoculación en ratón). Clave: 1D2612005 y Aislamiento *Trypanosoma cruzi* a partir de muestras de sangre (cultivo). Clave: 1D2612004

3.- Infección congénita

El diagnóstico de infección congénita se realiza por métodos parasitológicos a partir del nacimiento y durante los primeros meses de vida, y por métodos serológicos, a partir de los 9 meses.

La observación del parásito confirma el diagnóstico, mientras que la detección de anticuerpos puede ser enmascarada por los anticuerpos maternos.

En casos congénitos, se debe aplicar el algoritmo de diagnóstico parasitológico de fase aguda, se recomienda el uso de micrométodos; microhematrocrito o microstrout. Cuando se determinan anticuerpos en hijos de mujeres seropositivas, es necesario construir una curva serológica que muestre la cinética de los niveles de IgG sérica específica a *T. cruzi*. En la curva se pueden presentar dos patrones mutuamente excluyentes.

- a) Si, el niño nace infectado, mantendrá o incrementará los niveles de anticuerpos durante el primer año de vida.
- b) Si, la positividad es por la presencia de anticuerpos IgG maternos, el catabolismo los reducirá y los títulos caerán hasta la negatividad entre los 6 y 12 meses de vida.

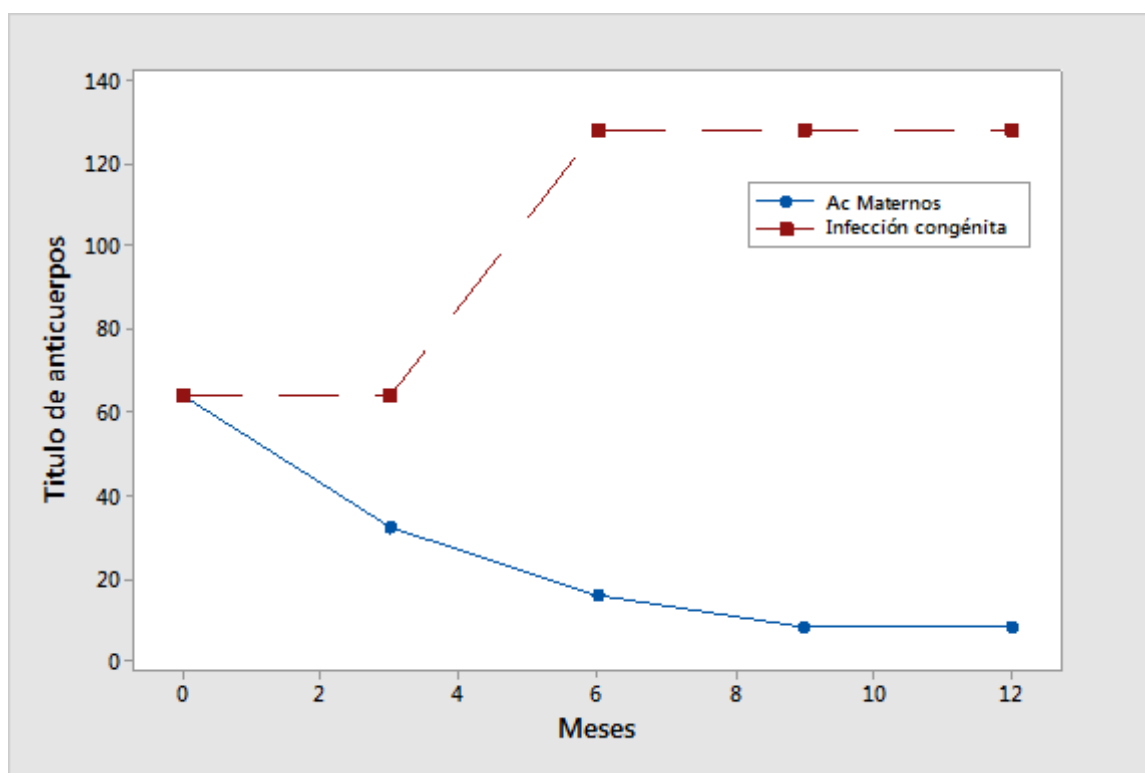


Figura. 7. Ejemplo cinética de anticuerpos IgG en hijo infectado de madre chagásica durante el primer año de vida.

Abordaje parasitológico y serológico durante el primer año de vida en hijo infectado de madre chagásica.

Caso	Abordaje parasitológico		Abordaje serológico			Interpretación
	Neonato	12 meses	Neonato	3- a 6 meses	9 a 12 meses	
1	Presencia de parásito	NA	Positivo	Positivo	Positivo	Se confirma infección de madre a hijo (conatal)
2	Ausencia de parásito	Presencia de parásito	Positivo	Positivo	Positivo	No se confirma infección de madre a hijo (conatal)
						Posible causa: vectorial, transfusional, digestiva)
3	Ausencia de parásito	Ausencia de parásito	Positivo	Positivo	Positivo	Origen de infección no confirmado
4			Positivo	Positivo débil o indeterminado (pruebas discrepantes)	Negativo	Ausencia de infección

Tabla 4. Posibles escenarios en abordaje parasitológico y serológico en la confirmación de infección congénita. La infección congénita solo se confirma al detectar el parásito y descartar cualquier otra vía de infección.

En cuanto a la efectividad del tratamiento etiológico, es importante considerar la experiencia sudamericana que recomienda, independientemente de cuál haya sido la vía de infección, se administre lo más pronto posible. Se recomienda iniciarlo antes de los tres años de vida, por lo cual resulta muy importante realizar el diagnóstico lo más oportuno posible.

El tratamiento etiológico en la fase aguda presenta una tasa de éxito terapéutico muy elevada, no así en la fase crónica. Así, en niños menores de 3 años alcanza casi el 100%, en niños entre 6 y 12 años disminuye del 62-56% y en el adulto sólo alcanza el 8-25%. La tolerancia al tratamiento es muy buena en el período neonatal, no así a mayor edad.

Seguimiento de tratamiento

El tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas está encaminado a eliminar el parásito y evitar la aparición y/o progresión de lesiones. Las indicaciones para el tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas, propuesta OMS y comunidad científica, son: en casos agudos, inclusive los congénitos; individuos en quimioprofilaxis (accidentes, trasplantes); episodios

de reactivación; crónicos de baja edad y crónicos recientes y formas clínicas iniciales.

Aunque la eficacia del tratamiento etiológico contra la infección por *T. cruzi* ha sido demostrada, las herramientas para su evaluación son aun de implementación e interpretación complejas. Las pruebas serológicas para el diagnóstico se basan principalmente en el reconocimiento inmunológico del parasite, por lo tanto, el principal criterio para definir la cura parasitológica es la seroconversión de positivo a negativa en dos pruebas serológicas convencionales, en la misma muestra realizada en el mismo día. Así, se puede asumir que el paciente seronegativo ha erradicado la infección. El seguimiento serológico es prolongado y los resultados obtenidos pueden ser controversiales.

En pacientes con evolución de por lo menos 20 años, la evidencia de seroconversión sólo puede observarse muchos años más tarde. La normatividad mexicana vigente recomienda el seguimiento anual. Se puede utilizar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para evaluar la eficacia del tratamiento, prueba que tiene un alto costo, requiere alta tecnología, personal calificado y requieren más estudios para su correcta aplicación.

Actualmente, es difícil determinar la eficacia del tratamiento dado que la negativización de la PCR no es concluyente y la seroconversión, usando pruebas serológicas convencionales, puede tomar décadas.

Las evidencias actuales confirman que el éxito terapéutico, para erradicar la infección con *T. cruzi*, depende en gran medida del tiempo del establecimiento de la infección y el inicio del tratamiento.

La falta de biomarcadores específicos para establecer la cura son factor limitante en la evaluación de la respuesta terapéutica a la enfermedad de Chagas, así como en el desarrollo de medicamentos más efectivos.

Aseguramiento de la calidad

El proceso de diagnóstico lo podemos dividir en tres subprocesos; la fase pre-analítica, analítica y post-analítica. Hay evidencias que la mayoría de los errores ocurren en la fase pre-analítica o post-analítica y son menores en el subproceso analítico. Sin embargo, los errores en el subproceso analítico, presentes en menor proporción, son causa importante de riesgos y daño para la seguridad del paciente.

La confiabilidad de los resultados emitidos por los laboratorios se asegura por los procedimientos de control de calidad, las recomendaciones internacionales (ISO 15189) y nacionales (NOM-007-SSA3-2011) declaran, de fundamental importancia, la

implementación de al menos dos procedimientos de control: a) control de calidad interno (CCI) y b) control de calidad externo (CCE).

- a) El CCI establecer el uso diario de sueros control de baja reactividad, controles independientes al estuche utilizado, estos deben ser introducidos sistemáticamente en todas las corridas analíticas. Las corridas analíticas son validadas de acuerdo a criterios de aceptación y rechazo establecidos previamente. Estos criterios deben ser seguidos y obedecidos.

Tabla 5. Criterios de uso sueros control para monitorear las corridas analíticas en el laboratorio

Los sueros control de baja reactividad deberán ser ajustados para cada estuche, rango recomendado, razón valor de lectura / valor de corte de 2.0 a 4.5. Los sueros control negativo rango recomendado, razón valor de lectura / valor de corte < 0.8.
Los sueros control se deben aplicar a todas las corridas analíticas y hacer el análisis de resultados registrados en el gráfico de Levey-Jennings.
Se deben validar las corridas analíticas siguiendo los criterios mínimos de aceptación.
Se deben re-estandarizar los parámetros del gráfico de Levey-Jennings en cada cambio de lote del estuche de diagnósticos utilizado.
Se recomienda que los nuevos lotes de estuches de diagnósticos sean evaluados utilizando paneles de sueros con muestras reactivas y no reactivas, bien caracterizadas. (evaluación lote a lote).

- b) El CCE establecer la participación en programas de evaluación externa con una frecuencia de al menos dos veces al año.

Es responsabilidad del Laboratorio tener procedimientos que monitoreen en el tiempo la exactitud y precisión del proceso analítico completo, se debe establecer el número, tipo y frecuencia de materiales de control a utilizar. Los procedimientos control deben ser suficientemente sensibles para detectar inmediatamente errores debido a falla del sistema de prueba, condiciones ambientales adversas y rendimiento del operador.

Todo laboratorio:

- Debe tener procedimientos documentados e información sobre las actividades de los subproceso, para asegurar la validez de resultados.
- Seleccionar procedimientos de examen que han sido reconocidos para su uso previsto.
- Aplicar un programa de control interno de la calidad para los procedimientos de examen que realiza para la enfermedad de Chagas y evaluación en cambio de lotes de reactivos.
- Participar al menos en un programa de evaluación externa de la calidad, en el cual integrará los procedimientos de examen que realizan.
- Demostrar documentalmente, que ha realizado la evaluación de cada uno de los procedimientos de examen y desarrollara una investigación encaminada a solucionar la problemática de aquellos procedimientos de examen en los que la calidad no sea satisfactoria.

CALIDAD EN EL SERVICIO DIAGNÓSTICO

De acuerdo con la NOM-035-SSA3-2012, En materia de información en salud, el contar con información oportuna y de calidad permite coadyuvar a la planeación del Sistema Nacional de Salud para reforzar las acciones de atención a los problemas sanitarios y factores que condicionen y causen daño a la salud.

Para cumplir con los estándares de calidad en la RNLSP es indispensable apegarse a los Criterios de Operación para la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública Componente Vigilancia Epidemiológica, implementar y mantener un Sistema de Gestión de la Calidad en apego a los requisitos de las normas ISO (International Organization for Standardization) 9001:2015 Sistemas de Gestión de la Calidad e ISO 15189:2015 Requisitos de la calidad y competencia y NORMA Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos.

Además, alinearse a los requisitos establecidos en el Manual Caminando a la Excelencia, los criterios de liberación de pruebas diagnósticas y cumplir con los indicadores de calidad en el servicio diagnóstico establecidos para la RNLSP.

Fase pre-analítica: Estos indicadores (Oportunidad en la toma, el envío y porcentaje de rechazo) comprenden actividades propias del área de vigilancia epidemiológica que inciden en la calidad de la muestra.

- **Oportunidad en la Toma:** La muestra oportuna debe considerar la fase de la enfermedad. En casos probables de estar en fase agudo, se deben tomar una muestra sanguínea (punción digital o sangre total con anticoagulante) y realizar pruebas directas de preferencia micrométodos y para serología (fase aguda) deberá esperar al menos tres a cuatro semanas. En recién nacidos las muestras, para micrométodos y serología, deben ser obtenidas a la par, ver Cuadro 1. Toma y manejo de muestras clínicas.
- **Oportunidad en el envío:**
 - **Suero o Plasma:** Conservar la muestra a 4 °C por un máximo de 5 días o congelada a - 20 °C. Enviar al LESP o InDRE, en tubo plástico con tapa hermética, no utilizar vidrio, seguir las medidas de bioseguridad y mantener la temperatura (Red de fría).
 - **Sangre total para Métodos directos:** Gota gruesa y/o extendido, conservada a 4 °C por un máximo de 3 días. Micro métodos, conservar la muestra a temperatura ambiente y enviar lo más rápido al LESP o InDRE, ya que la técnica se basa en la observación del movimiento del parásito. Enviar, en tubo plástico con tapa hermética, no utilizar vidrio, seguir las medidas de bioseguridad y mantener la temperatura, ver Cuadro 1. Toma y manejo de muestras clínicas.
- **Porcentaje de rechazo:** La proporción de rechazos permitida es del $\leq 1\%$. Cuando se registre mayor al 1% del rechazo, el laboratorio debe comunicar al área de vigilancia epidemiológica las oportunidades de mejora con la finalidad de que realicen las acciones conducentes.

Fase analítica: este indicador (estándar del servicio) competen a la RNLSP e inciden en la obtención de un resultado confiable y oportuno.

- **Estándar del Servicio:** Aplicara desde la recepción de la muestra en el laboratorio hasta la obtención de su resultado. El tiempo máximo para el reporte de resultados depende del tipo de servicio solicitado.
- Para diagnóstico serológico, el estándar es de: 10 días hábiles
- Para control de calidad y referencia serología: 15 días hábiles
- Para diagnóstico parasitológico:
 - Frotis/Gota gruesa/micrométodos: 1 día (caso agudo documentado y envío oportuno).

- o Hemocultivo e inoculación en ratón: 90 días hábiles.

PROGRAMA DE EVALUACIÓN EXTERNA DEL DESEMPEÑO

El Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) genera información de orden nacional, integrando y siendo rector de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública, en materia de diagnóstico, investigación y desarrollo tecnológico para la vigilancia epidemiológica, para la toma de decisiones en el control de enfermedades y la formulación y orientación de los programas nacionales de salud.

En este sentido, uno de nuestros compromisos es que el InDRE y la RNLSP generen información confiable y oportuna para la toma de decisiones para la vigilancia epidemiológica, la promoción de la salud y la prevención de enfermedades; necesarias para lograr las metas y objetivos, en apego a la normativa vigente, los programas de acción específicos y las buenas prácticas de laboratorio.

En el 2001, el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas fue incorporado al marco analítico básico de los Laboratorios Estatales de Salud Pública, quienes en agosto de 2008 ratificaron la importancia de fortalecer su aplicación en todo el país. En octubre de 2008, se inició el Programa de Evaluación Externa del Desempeño del Diagnóstico Serológico de la Enfermedad de Chagas (PEED-SEROCHAGAS) con la participación de los LESP que declararon las pruebas en el marco analítico estatal registrado en el InDRE. Con esta base, el PEED-SEROCHAGAS se suma al esfuerzo institucional de fortalecer el desempeño de los laboratorios de la RNLSP y de apoyo.

El objetivo principal del Programa es armonizar las normas de trabajo para alcanzar un desempeño óptimo de las pruebas de diagnóstico utilizadas y que permita la comparabilidad de resultados entre laboratorios.

Esta actividad proporciona información a los participantes para adherirse a buenas prácticas de laboratorio:

- Mantener y mejorar la calidad analítica, control de calidad interno
- Mejorar el acuerdo entre laboratorios, control de calidad externo
- Detectar fallas de equipos, identificar problemas de reactivos e identificar necesidades de capacitación del personal
- Iniciar y evaluar acciones correctivas
- Comparar el rendimiento con diferentes métodos analíticos

El monitoreo continuo ayudará a reducir los errores de laboratorio, producir resultados precisos y lo más importante generar resultados de utilidad clínica o epidemiológica que contribuyan positivamente al diagnóstico de este padecimiento en nuestro país.

Metodologías evaluadas.

Para las pruebas de detección de anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi*, sólo se evalúan las metodologías convencionales (HAI, ELISA e IFI) y convencionales mejoradas.

No se evalúan las pruebas suplementarias, como el WB y las pruebas no convencionales como las pruebas rápidas.

Envío de paneles de eficiencia

El laboratorio de Chagas del InDRE coordina el PEED-SEROCHAGAS y se encarga de:

- Producir el panel de sueros con respaldo documentado de las características de reactividad de cada muestra.
- Embalar el panel en condiciones óptimas para el envío a los laboratorios participantes, incluyendo instrucciones detalladas para el manejo del mismo.
- Elaborar los reportes de resultados y enviarlos a los participantes.
- Mantener la confidencialidad de los laboratorios participantes mediante una clave única.

Se envía un panel de sueros obtenidos de plasma por procedimientos estandarizados, utilizados por expertos colaboradores de la OMS. Contiene muestras con positividad para el marcador de enfermedad de Chagas y negativas para todos los marcadores virales utilizados en el tamizaje en banco de sangre.

Se trata de un panel de sueros, caracterizados con todas las pruebas del algoritmo de diagnóstico del InDRE (HAI, IFI, ELISA, WB) y los estuches comerciales disponibles actualmente en el mercado nacional.

El envío de un primer panel será la segunda semana de marzo del año en curso, y el segundo envío será en segunda semana de septiembre del año en curso.

Reporte de datos y resultados

Los resultados deberán ser registrados en el formato CHAG-F-21, el cual se enviará vía electrónica a los LESP participantes. Se recomienda descargarlo en formato Excel, no guardarlo como imagen, para facilitar su llenado leer cuidadosamente el instructivo de llenado que se encuentra en el mismo archivo. Una vez completado el formato en Excel deberá ser enviado vía electrónica a serpasten_60@yahoo.com, sergio.pasten@salud.gob.mx en la fecha y hora acordadas. El formato impreso y firmado en original, deberá ser enviado por oficio a la Dirección General Adjunta del InDRE con atención al Director General.

Informe de resultados PEED SEROCHAGAS a RNLSP

Los resultados serán expresados en; resultados concordantes, resultados falsos positivos y falsos negativos los cuales se presentarán en cuadros y gráficos, con las cifras globales e individuales.

Se realizará un informe preliminar con los resultados de concordancia por participante será enviado a cada participante cuatro semanas después de la entrega de resultados a InDRE. El objetivo de este informe preliminar es hacer precisiones y/o aclaraciones por parte de los laboratorios participantes.

El informe final detallado se envía cuatro semanas después del envío del informe preliminar.

Acciones de seguimiento si el Laboratorio presenta resultados diferentes a lo esperado.

Usted debe identificar las posibles causas de estas desviaciones e implementar acciones preventivas y correctivas.

Se debe enviar al Departamento de Parasitología del InDRE, dos semanas antes del envío del siguiente panel, el programa de acciones preventivas y correctivas indicando que va a implementar y los resultados de la implementación en el LESP.

Cronograma de actividades:

Tabla 6. Cronograma anual de actividades PEED SEROCHAGAS

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA													
LABORATORIO DE ENFERMEDAD DE CHAGAS													
No.	Actividad	Tiempo en meses											
		ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC
1	Envío primer panel a la RNLSP			xx									
2	Recepción de resultados en InDRE (primer panel), fecha límite.			xx									
3	Envío resultados preliminares a la RNLSP (primer panel)				xx								
4	Envío informe final a la RNLSP (primer panel)					xx							
5	Envío de segundo panel a la RNLSP									xx			
6	Recepción de resultados en InDRE (segundo panel), fecha límite.									xx			
7	Envío resultados preliminares a la RNLSP (segundo panel)										xx		
8	Envío informe final a la RNLSP (segundo panel)											xx	

CRITERIOS PARA LA LIBERACIÓN DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS EN LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS PARA LA VIGILANCIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

a) Para obtener la liberación diagnóstica el LESP deberá:

1. Tener establecido un algoritmo de diagnóstico de al menos dos pruebas, con un diseño en paralelo, con pruebas de alto desempeño, una debe utilizar antígenos totales como fuente de antígeno y la otra antígenos recombinantes. Los procedimientos de examen deben ser validados o verificados, tan extensa como sea necesario.
2. Deberá tener la documentación relativa a los subprocesos para análisis, análisis y pos análisis.
3. Deberán tener un programa de control interno de la calidad para todas las pruebas de laboratorio que realiza.
4. Participar en el PEED SEROCHAGAS por dos ciclos seguidos con una calificación $\geq 95\%$.
5. Tener concordancia (C) en el BCE $\geq 97.5\%$.
6. Participar en el Curso-Taller anual.

b) Para mantener su liberación diagnóstica el LESP deberá:

1. Cumplir con todo lo anterior.
2. Asegurar el abasto de relativo para dar continuidad al diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas
3. Enviar del 100% de muestras positivas de acuerdo a:
 $(\text{No., de muestras recibidas InDRE} / \text{No. de muestras reportada en SIS}) \times 100$
4. Enviar del 10% de muestras negativas de acuerdo a:
 $(\text{No., de muestras recibidas InDRE} / \text{No. de muestras reportada en SIS}) \times 100$

c) Perderá su liberación diagnóstica el LESP cuando:

1. No cumpla con algún punto de lo señalado anteriormente.
2. Si el LESP requiere confirmar su desempeño técnico, debe solicitar un nuevo panel, cuyo costo es de acuerdo al tabulador vigente. El panel deberá ser solicitado dentro de los siguientes 10 días hábiles, después de haber recibido el informe final. Cabe mencionar que la calificación obtenida en este panel no será tomada en cuenta para el Boletín Caminando a la Excelencia.
3. Concordancias no aceptables (<95%) en el segundo panel, requerirán de capacitación y de establecer nuevamente el envío de muestras para realizar diagnóstico en el InDRE.

BANCO DE MATERIAL BIOLÓGICO EN EL InDRE

El objetivo del banco es obtener material de control y referencia con una calidad adecuada que permita calibrar reactivos diagnósticos de elaboración propia, evaluar el desempeño de equipos de diagnóstico comerciales y ser utilizado en protocolos de investigación.

Características de la muestra:

- Debe ser de al menos 1.0 mL.
- Debe ser fresca, si no es así asegurarse que ha sido conservada adecuadamente, de preferencia congelada a -20°C .
- No lipémica
- No hemolizada
- No contaminada

Si cumple lo anterior es fraccionada, etiqueta y congela a -60°C hasta su uso.

El material ingresado al banco se registra en una bitácora de control y seguimiento.

Respaldo documental

En Archivo del Banco de Sueros debe existir la historia clínica o formato único de envío de muestras al InDRE y registro de los resultados del LESP como del InDRE.

BIBLIOGRAFÍA

1. Chagas Congénito: Estrategias de diagnóstico y Control. 2007. 2da. Edición. Cochabamba – Bolivia.
2. Fierz, W. 2004. Basic Problems of Serological Laboratory Diagnosis in: Methods in Molecular Medicine, vol. 94: Molecular Diagnosis of Infectious Diseases, 2/e Edited by: Decker, J and Reischl. U. Humana Press Inc. Totowa, NJ.
3. Guzmán Bracho C, Floriani Verdugo J, Pastén Sánchez S y col. 2000. Manual de procedimientos para laboratorios de diagnóstico de enfermedad de Chagas o tripanosomosis americana. Secretaria de Salud. InDRE, México.
4. Guzman Bracho C. Epidemiology of Chagas disease in Mexico:an update. TRENDS in Parasitology. 2001; 17(8):372-376.
5. Luquetti AO, Rassi A 2002. Conferencia: Perspectiva del uso de la serología (Ag naturales y otros) en la evaluación de la eficacia del tratamiento etiológico. Available from URL:<http://www.fac.org.ar/fec/chagas2/llave/c003/luque.htm>.
6. Luquetti AO. 2007. Diagnóstico de la enfermedad de Chagas: Diagnóstico serológico, xenodiagnóstico, hemocultivo, reacción en cadena de la polimerasa y examen directo. En: Enfermedad de Chagas. Sociedad Colombiana de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. 1ª Ed. Pág. 25-31.
7. Luquetti AO., Rassi A. 2007. Tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas. Experiencia en Brasil. En: Enfermedad de Chagas. Sociedad Colombiana de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. 1ª Edición, Pág. 145-148.
8. NOM-032-SSA2-2014, para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector.
9. Pastén Sánchez S. Manual de Técnicas de Laboratorio. Laboratorio de Enfermedad de Chagas. InDRE, México 2003.
10. Secretaria de vigilância em saúde do ministério da saúde: Consenso brasileiro em doença de Chagas. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2005; 38 (Sup. III):1-30.

11. WHO. Control of Chagas Disease: second report of the WHO expert committee. Geneva 2000.
12. WHO. Manual of basic techniques for a health laboratory. 2nd ed. Geneva 2003.
13. WHO. Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. TDR/GTC/06. Geneva 2005.
14. WHO. Consultation on International Biological Reference Preparations for Chagas Diagnostic Test. Switzerland 2007.
15. WHO. Anti-trypanosoma cruzi assays: operational characteristics. Diagnostics and Laboratory Technology. Geneva 2010.
16. WHO. Control of Chagas Disease. Report of a WHO Expert Committee. WHO Tech. Rep. Ser. 1991:811.
17. Schmunis G. A. Iniciativa del Cono Sur. Proceedings of the second International Workshop on Population Genetics and Control of Triatominae. Tegucigalpa, Honduras. INDRE, México City. 1999:26-31.
18. Hoffman C. Nota acerca de un probable transmisor de la tripanosomiasis humana en el Estado de Veracruz. Rev Mex Biol. 1928; 8:12-18.
19. Mazzotti L. Dos casos humanos de enfermedad de Chagas en el estado de Oaxaca. Gac. Méd. Mex (Méx). 1940; 70:417-420.
20. Pinto Dias JC. Epidemiology of Chagas' disease In: Chagas' disease (American Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine. Wendel S, Brener Z, Camargo ME, Rassi A (editors). ISBT Brazil'92, Sao Paulo, Brazil. 1992:49-80.
21. Miller MJ, et al. Guidelines for safe work practices in human and animal medical diagnostic laboratories. MMWR Surveill Summ. 6; 61:1-102; 2012.
22. Guidelines for Biosafety Laboratory Competency. MMWR. Supplement / Vol. 60; 2011.
23. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2013-2014; Geneva: WHO Press; 2012.
24. Chosewood C & Wilson DE. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories – 5th ed. CDC-NIH; 2009.
25. European Committee for Standardization. CWA 15793:2011 Laboratory biorisk management standard. Brussels: CEN; 2011.
26. World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual – 3rd ed. Geneva: WHO Press; 2004.
27. Edgardo Moretti y cols. Manejo de la transmisión congénita. Estado actual y perspectivas. Pp.167-178. En: Organización Panamericana de la salud. La enfermedad de Chagas, a la puerta de los 100 años del conocimiento de una endemia americana ancestral OPS/CD/426-06. 2007.
28. Plebani, M. (2014). The journey toward quality and patient safety in laboratory medicine continues. North American Journal of Medical Sciences, 6(5), 229.

29. NOM-007-SSA3-2011, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos.
30. Amadeo Sáez-Alquezar, Pedro Albajar-Viñas, André Valpassos Guimarães, José Abol Corrêa. Control de calidad en el tamizaje para enfermedades infecciosas en bancos de sangre. ¿Por qué? y ¿cómo? eJIFCC. 2015. Vol26. No4. 286-294.
31. Secretaria de Salud (2019). MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN MÉXICO. CENAPRECE (2019). México. Recuperado de <https://www.gob.mx/salud/cenaprece/documentos/manual-de-procedimientos-para-la-enfermedad-de-chagas-en-mexico?idiom=es>
32. Luquetti AO and Schmuñis, GA. (2017). Diagnosis of Trypanosoma cruzi infection. En: American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research. Edited by Jenny Telleia and Michel Tibayrenc. Elsevier Inc. Second Edition. Pág. 687-730.
33. Araujo-Jorge, TC & Pírmes, C. (2000). Normas de segurança para o trabalho com Trypanosoma cruzi. En: Doença de chagas: manual para experimentação animal. Organizer Araujo- Jorge, TC and Castro SL. (2000). Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. p. 125- 132. Recuperado de <http://books.scielo.org/id/cdbjg>.
34. Basso, B y Moretti, E. Diagnóstico de Laboratorio I y II. Fortalecimiento de la Enseñanza de la Enfermedad de Chagas. Recuperado de <https://blogs.unc.edu.ar/chagas/bibliografia/>

ANEXOS

Anexo I: Bioseguridad

Reglas generales de Bioseguridad Nivel 2 que debe ser implementado para trabajar con *T. cruzi*.

Descarte y recogida de material biológico:

1. Descontaminar (en autoclave o desinfectante) todo el material usado antes de retirarlo del laboratorio, incluso antes de embalar material desechable para su eliminación;
2. Desinfectar las superficies de trabajo después del término del trabajo;
4. Desinfectar equipos (centrífugas, microscopios, etc.) después del uso;
5. Desinfectar material reutilizable, para inactivar el *T. cruzi*, antes del lavado;
6. Condiciones de esterilización a vapor: 30 min a 120 °C (15 psi);

Eliminación de tejidos o animales infectados:

- los tejidos o animales muertos, infectados, NO deben ser descartados en la basura común;
- Los tejidos o animales después del sacrificio, colocarlos en bolsas plásticas bien selladas esterilizar o incinerarla

Medidas de prevención de accidentes:

1. Informar al personal de limpieza y brigadas de emergencia la naturaleza el trabajo que se realiza allí.
2. Informar al personal de mantenimiento la naturaleza el trabajo que se realiza allí y que los equipos están descontaminados, deberá siempre acompañarse por personal responsable.

2. El personal de mantenimiento (instalaciones físicas y equipos) debe usar equipos de protección personal;
3. Informar al personal médico de la institución de la naturaleza del trabajo que se realiza, de manera que puedan establecerse procedimientos para el seguimiento y tratamiento;
4. Todo el personal involucrado en el trabajo con *T. cruzi* debe ser monitoreado serológicamente cada seis meses.

Procedimiento en caso de accidente con *Trypanosoma cruzi*

1. Contener el material contaminado con *T. cruzi*:
 - A) Evitar que el líquido se propague, cubriendo con material absorbente seco y colocar desinfectante. Descontaminar el material absorbente (Autoclave o desinfectante)
 - B) prevenir que residuos sólidos contaminados sean transportados en la suela de los zapatos o prendas de vestir.
2. Atender a los individuos expuestos a los riesgos durante el accidente
3. Cuando se proyectan aerosoles y / o gotitas, limpiar el sitio con un tejido empapado en 70% de alcohol, la ropa o piel saturar el área con alcohol al 70%;
4. Limpiar la piel inmediatamente con alcohol u otro desinfectante;
5. Si hay contacto con ojos o mucosas, lavar bien con agua corriente utilizando lavajojos.
6. Las heridas superficiales deben ser lavadas a fondo, y cauterizadas con nitrato de plata.
7. heridas puntuales (aguja) deben ser exprimidas para obtener tanta sangre como sea posible y cauterizado;
8. Reporte el accidente al médico responsable y tomar las acciones apropiadas; toma de muestra basal, tratamiento, seguimiento clínico y de laboratorio.
9. Durante los primeros 15 días después del accidente, cada tres días, realizar gota gruesa y micrométodos en busca del parásito.

10. Si es posible realizar serología, de fase aguda, detección de IgM, en los días cero, quince y treinta después del accidente.

11. Si el riesgo de infección es leve, monitorear la sangre durante unos meses más, con serología IgG anti *T. cruzi*.

12. Si el riesgo de infección es grande, tratar inmediatamente con benznidazol, no aguardar a la evidencia de infección.

13. Informar el accidente a la autoridad de salud pública competente, rellorando el formulario de notificación de accidentes de la institución; notificar a la jefatura inmediata ya a la coordinación de salud del trabajador.

RECOMENDACIÓN DE LA OMS: cuando se produzca un accidente, iniciar inmediatamente el tratamiento específico, incluso antes de tener evidencia parasitológica o serológica de infección

Anexo II: Técnicas diagnósticas: Abordaje parasitológico

1. Frotis sanguíneo (Identificación morfológica de *Trypanosoma cruzi* en muestras de sangre. Clave InDRE 1D2612002).

Esta técnica se utiliza también para detectar otros protozoarios hemáticos. En el caso de *T. cruzi* se observan los tripomastigotes como estructuras alargadas en forma de "S" o "C" entre los eritrocitos. Los frotis deben de ser lo suficientemente delgados para poder leer un texto a través de la extensión. Los portaobjetos deben estar limpios y desgrasados.

a. Material y equipo

- alcohol metílico grado reactivo
- colorante de Giemsa
- lancetas
- microscopio
- portaobjetos
- solución amortiguadora de fosfatos de pH 7.2

- torundas de algodón humedecidas en alcohol etílico al 70%
- torundas de algodón secas

b. Procedimiento

1. Realizar la punción digital.



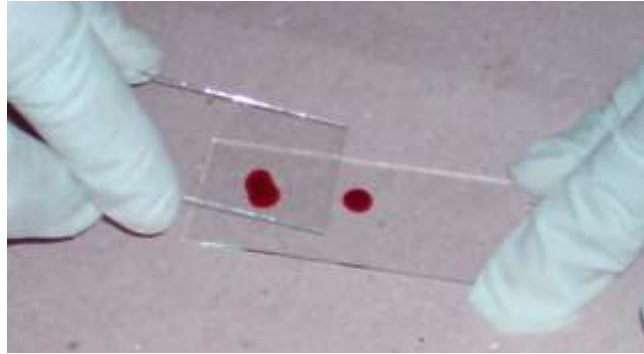
2. Desechar la primera gota de sangre y limpiar con una torunda de algodón seca.



3. Obtener una segunda gota de sangre y colocarla sobre la mitad de una de las caras de un portaobjetos desengrasado, sosteniéndola por sus bordes laterales



4. Colocar frente a la gota un portaobjetos auxiliar en ángulo de 45°, dejar que la gota de sangre se extienda entre el borde de la laminilla auxiliar y la cara de la primera laminilla. sujetarla por sus bordes laterales.



5. Proceder a extender la muestra deslizando la laminilla auxiliar sobre la cara de la primera laminilla, con un movimiento uniforme hacia el extremo libre del portaobjeto, sin detenerse ni despegar hasta terminar el extendido.



6. Dejar la preparación sobre una superficie horizontal hasta que se seque (protegerla de polvo, moscas y otros insectos).
7. Identificar el extendido escribiendo con lápiz sobre la sangre el nombre, edad y sexo del paciente. El frote siempre se deberá fijar con alcohol metílico antes de enviar.



8. Para fijar el extendido, introducir la parte correspondiente al frote en un recipiente de boca ancha conteniendo alcohol metílico sin diluir, escurrir el alcohol excedente, sin que se moje la gota gruesa.
9. Colocar el portaobjeto sobre una superficie horizontal hasta que seque.
10. Teñir con Giemsa como se indica en el procedimiento de tinción de la gota gruesa.

Punto crítico

Realizar el extendido de manera uniforme. Evitar que se moje la gota gruesa con el alcohol metílico. Usar portaobjetos limpios y desengrasados.

2. Gota gruesa (Identificación morfológica del agente en muestras de sangre Clave InDRE 1D2612002)

Es un método de concentración para buscar parásitos sanguíneos y tiene mayor sensibilidad que el examen directo y el frote. Es indispensable hemolizar la muestra sanguínea para que los eritrocitos acumulados no impidan la observación de los parásitos.

a. Reactivos, material y equipo

- lancetas estériles desechables
- microscopio
- portaobjetos
- torundas de algodón con alcohol etílico al 70 %

b. Procedimiento

1. Obtener otra gota de sangre de la misma punción de donde se obtuvo la anterior, para el frote sanguíneo (punto anterior).
2. Obtener la muestra del dedo apretándolo suavemente por sus bordes laterales hacia su extremo.
3. Sobre la misma cara del portaobjetos donde se hizo el extendido sólo que en la parte media libre, colocar otra gota de sangre más grande que la anterior.
4. Con el ángulo de un portaobjeto auxiliar y con movimientos circulares se extiende la gota en un cuadro de más o menos 1 cm por lado.
5. Dejar la preparación sobre una superficie horizontal hasta que se seque, abanicar con la mano para obtener un secado más rápido (protegerla del polvo, moscas y otros insectos).

Punto crítico

La gota gruesa no se debe poner en contacto con alcohol metílico por lo que se debe cuidar de no introducir la porción del portaobjetos con la gota gruesa en el alcohol, ni dejar que escurra el fijador sobre de ella.

Tinción

Preparar la solución de trabajo del colorante Giemsa con solución amortiguadora de fosfatos realizando una dilución 1:10 de la solución madre.

1. Cubrir las láminas con la solución de trabajo y dejar teñir durante 30 minutos.
2. Transcurrido el tiempo de tinción lavar el frote con agua de la llave.
3. Colocar sobre una superficie horizontal hasta que se seque.

Punto crítico

El tiempo de tinción debe de estandarizarse cada vez que se prepara colorante.

Lectura

1. Enfocar primero la gota gruesa, utilizando los objetivos de menor a mayor aumento.
2. Cubrir con aceite de inmersión y enfocar hasta conseguir una imagen nítida con el objetivo de inmersión.
3. Emplear siempre filtro azul.
4. Buscar sistemáticamente la presencia del parásito en todo el portaobjeto hasta asegurarse de dar un resultado final correcto.
5. Observar todos los campos microscópicos de ambas muestras antes de emitir un resultado negativo.

3. Micrométodos:

3.1 (Identificación rápida en sangre de *Trypanosoma cruzi* (microhematocrito). Clave InDRE 1D2612001)

La fase aguda se manifiesta entre los 7 y 15 días y permanece entre 2 y 4 meses. Se caracteriza por presentar parásitos circulantes en sangre, la detección de parásitos es una señal inequívoca de la infección por *T. cruzi*. Cuando la sangre heparinizada se centrifuga, se observan 3 capas una roja de eritrocitos, otra capa blanca de leucocitos y la parte líquida que es el plasma. En la interfase leucitos-plasma se pueden observar los tripanosomas por su movimiento. Esta técnica se utiliza también para detectar otros parásitos hemáticos como *plamodium* y *microfilaria*.

a. Materiales y Equipo

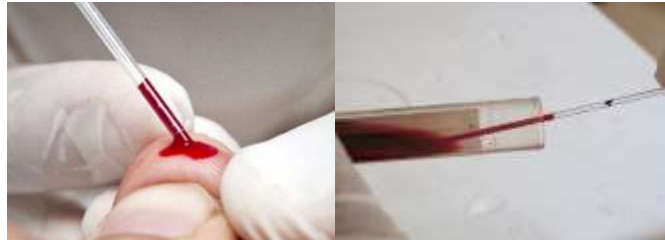
- Tubos capilares para microhematocrito, heparinizados.
- Portaobjetos y cubre objetos limpios y desengrasados
- Torundas de algodón
- Lanceta estéril
- Guantes
- Alcohol al 70%

- Lápiz de grafito
- FormatoderegistroN-1
- Contenedor de RPBI
- Centrifuga para microhematocrito, velocidad máxima 13, 000 rpm.
- Microscopio óptico
- Mechero Bunsen o lámpara de alcohol

b. Procedimiento

9.2 Procedimiento:

1. Llenar el tubo capilar a dos tercios de su longitud, con sangre capilar o venosa. Parar la toma de muestra de sangre capilar el tubo debe ser heparinizado (girar el tubo entre los dedos índice y pulgar para mezclar con el anticoagulante). Para la obtención de sangre venosa se debe utilizar como anticoagulante heparina o EDTA.



2. Sostener el capilar con pinzas sin ejercer mucha presión, sellar el extremo vacío a la flama, solo se debe introducirse a la flama no más dos milímetros y esperar a que se funda el vidrio y se forme al sello. Dejar enfriar.



3. Identificar el tubo con su clave correspondiente y disponen los capilares de forma encontrada en el rotor de la centrifuga de microhematocrito. No olvidar colocar la tapa, puede generar accidente por rotura de los capilares.



4. Centrifuga a 10,000 rpm durante 5 minutos, esperar a que la centrífuga se detenga, retire los capilares y colóquelos en una gradilla, identificando correctamente los capilares. Se deben mantener de forma vertical hasta su lectura.



5. Parar su lectura el capilar se coloca en un soporte hecho en un portaobjetos donde se coloca plastilina en los extremos, con la ayuda de una laminilla se hacen dos ranuras sobre la plastilina de tal forma que se ajusten dos capilares a lo largo del portaobjetos, sin presionar al centro. Se coloca un cubreobjetos sobre la interface leucocitos-plasma de los capilares y entre el portaobjetos y el cubreobjetos se llenar con agua destilada.

6.

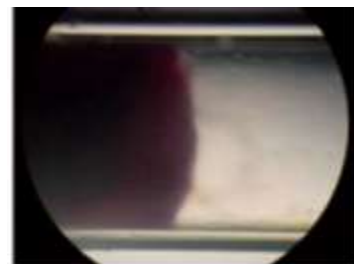
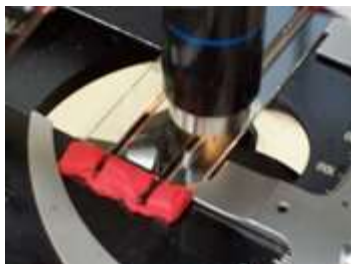


2008;6(6):369-74.



Schneider et al. An Pediatr Contin.

7. La lectura se realiza a nivel de la interface leucocitos-plasma buscando las formas móviles de *T. cruzi* que se encuentran por encima del paquete de glóbulos blancos, la lectura debe ser sistemática en cuatro tubos capilares.



Schneider et al. An Pediatr Contin. 2008;6(6):369-74.

8. Al observar con el objetivo 10x movimiento en la interface leucocitos-plasma, se cambia al objetivo 40x y se debe observar el movimiento característico de *Trypanosoma cruzi*. La identificación correcta del parásito en la interface leucocitos-plasma del tubo capilar requiere de capacitación.
9. Parar documentar, el tubo capilar se corta en la interface leucocitos-plasma, se prepara una extensión para tinción por la técnica de Giemsa.



Freilij H, et al. J Clin Microb 1983;18(2):327-30

Resultado:

Se informa la presencia o ausencia del parásito.

Punto crítico

La lectura debe ser inmediatamente después de la centrifugación, de lo contrario se puede producir lisis del tripomastigote.

3.2 Micrometodos (Identificación rápida en sangre de *Trypanosoma cruzi* (microstrout). Clave InDRE 1D2612001)

Examen microscópico de la fracción leucoplaquetaria de sangre venosa anti coagulada (heparina). a partir de un tubo tipo eppendorf cargado con sangre del paciente, en búsqueda de las formas tripomastigotes de *T. cruzi*, a través de la observación del movimiento.

c. Equipo

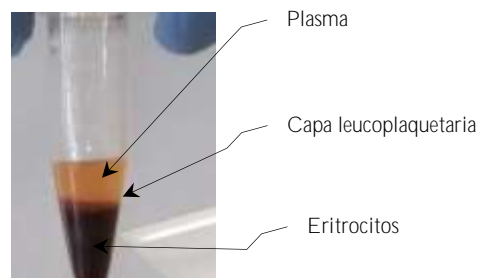
- Microcentrifuga para tubos tipo Eppendorf de 1.5/2.0 mL y rango de velocidad de 100 a 14,000 rpm.
- Microscopio óptico

Método:

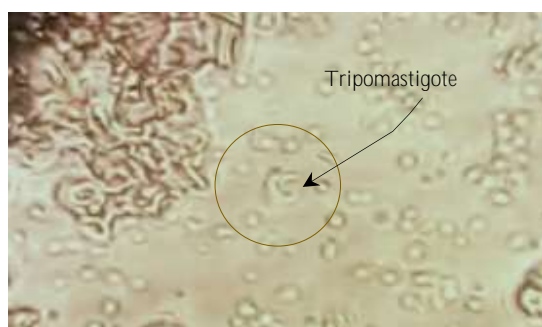
1. En un tubo de plástico tipo Eppendorf colocar 500 µl sangre venosa anti coagulada (heparina).



2. Tapar los tubos y colocar de forma encontrada en el rotor de la centrifuga, centrifugar por 1 minuto a 3000 rpm.



3. Parar su lectura, se colocar una gota de la capa leucoplaquetaria entre portaobjeto y cubre y se observa con el objetivo 10x si hay movimiento, se cambia al objetivo 40x, se debe observar el movimiento característico de *Trypanosoma cruzi*. Observar por 30 minutos. La identificación correcta del parásito requiere de capacitación.



4. Parar documentar el caso, se puede preparar una extensión para tinción con Giemsa.

Resultado:

Se informa la presencia o ausencia del parásito

Punto crítico

Identificar correctamente el tubo eppendorf con la clave correspondiente al paciente. La lectura debe ser inmediatamente a la centrifugación, de lo contrario se puede producir lisis del tripomastigote. Se deben observar al menos cuatro preparados.

Anexo II: Sensibilidad y especificidad de los equipos evaluados por el InDRE 2018

Resultados desempeño, evaluación realizada en IndRE 2018						
#	Método	Nombre comercial	Concordancia K	Esperada*		Observada**
				Sensibilidad AP	Especificidad PAN	
1	HA1	Chagatest HA1	0.88	>97.6%	86.6%	85.0% (73.9 - 91.9)
2	ELISA	Chagatest ELISA liado	0.97	100%	>98%	98.3% (91.1 - 99.7)
3	ELISA	CHAGASCREEN ELA ver 2.0	1.00	100%	>99.6%	100% (94.0 - 100.0)
4	ELISA	Chagas Bioendence	0.48	97.5%	97.5%	62.8% (51.7 - 72.7)
5	ELISA	Accuratrax Chagas Microelisa Test	1.00	100%	>99%	100% (94.0 - 100.0)
6	ELISA rec	Chagatest ELISA recombinante V4.0	0.96	100%	>98%	98.3% (91.1 - 99.7)
7	ELISA rec	Accuratrax Chagas Recombinante Microelisa Test	1.00	100%	>99%	100% (94.0 - 100.0)
8	ELISA rec	CHAGASCREEN PLUS ver 4.0	0.95	100%	>98%	100% (94.0 - 100.0)
9	Quimoluminisencia	Liason XL Murex Chagas	0.84	99.1% (98.2-99.7)	99.5% (98.2-99.9)	93.2% (83.8 - 97.3)

1 - 5: Pruebas convencionales; 6 - 8: Pruebas mejoradas con antígenos recombinantes y/o pérdidas simétricas; 9: Analizador quimoluminisencia; P, P: Porcentaje de acuerdo positivo; P/N: Porcentaje de acuerdo negativo; ND: no determinado.

(*) Valores declarados por el fabricante en el inserto de uso del producto. (**) Valores estimados en el estudio de evaluación en IndRE

Concordancia (K): se estimó incluyendo resultados no concluyentes (zonas gris de 0.90 a 1.1, SD). Para sensibilidad y especificidad no se consideraron los resultados no concluyentes.

Resultados precisión, evaluación realizada en IndRE 2018							
#	Método	Nombre comercial	Panel desempeño Accusart 0845-0073	Panel seroconversión Accusart TM 0815-0038	CV Intraensayo	CV Total	Especificidad analítica (Reactividad a Leishmaniasis)
1	HA1	Chagatest HA1	Acuerdo	ND	ND	ND	0.0%
2	ELISA	Chagatest ELISA liado	Acuerdo	Acuerdo	Acuerdo S > 0.60	Acuerdo S > 0.60	20.0%
3	ELISA	CHAGASCREEN ELA ver 2.0	Acuerdo	Acuerdo	Acuerdo S > 0.50	Acuerdo S > 0.50	20.0%
4	ELISA	Chagas Bioendence	Desacuerdo (2 FN)	Acuerdo	ND	ND	60.0%
5	ELISA	Accuratrax Chagas Microelisa Test	Acuerdo	Acuerdo	Acuerdo S > 0.740	Acuerdo S > 0.740	20.0%
6	ELISA rec	Chagatest ELISA recombinante V4.0	Acuerdo	Acuerdo	Acuerdo	Acuerdo	10.0%
7	ELISA rec	Accuratrax Chagas Recombinante Microelisa Test	Acuerdo	Acuerdo	Acuerdo	Acuerdo	10.0%
8	ELISA rec	CHAGASCREEN PLUS ver 4.0	Acuerdo	Acuerdo	Acuerdo	Acuerdo	0.0%
9	Quimoluminisencia	Liason XL Murex Chagas	Acuerdo	Acuerdo	Acuerdo	Acuerdo	0.0%

80

1939-2019
ISET-InDRE

SALUD

SECRETARÍA DE SALUD



Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud
Dirección General de Epidemiología

Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
"Dr. Manuel Martínez Báez"