Test de Diagnóstico para Chagas congénito.

Diagnosis Test for congenital Chagas disease.

Luciana Larocca, Fabiana G. Stolowicz, Adrián A. Vojnov, Carolina Carrillo.

Instituto de Ciencias y Tecnología Dr. César Milstein – CONICET. Saladillo 2468, Buenos Aires, Argentina. ccarrillo@fundacioncassara.com.ar

**Palabras Clave:**Chagas congénito, Diagnóstico, POC

La enfermedad de Chagas es una zoonosis causada por el parásito kinetoplástido *Trypanosoma cruzi*. Desde el punto de vista epidemiológico, el Chagas es una endemia originaria de América Latina, con al menos 10 millones de personas infectadas. Sin embargo, como consecuencia de las activas migraciones rural-urbana y de América al resto de los continentes, en la actualidad el Chagas se ha extendido a zonas tradicionalmente no endémicas, incluso a países donde la enfermedad resulta exótica y, por ello, de difícil diagnóstico y tratamiento. La transmisión, en estos casos, no está ocasionada por la presencia de vinchucas infestadas sino por otras vías como las transfusiones sanguíneas de donantes no chequeados/as o por transmisión vertical, en el embarazo.

Respecto de las terapias para tratar el Chagas, se cuenta con dos drogas que son relativamente efectivas en la fase aguda de la enfermedad y en los casos infantiles. Es importante resaltar que la probabilidad de cura aumenta cuanto más precoz es el diagnóstico.

Actualmente existen diversos métodos de diagnóstico serológico eficientes en adultos/as e infantes. Sin embargo dichos métodos no son aplicables en neonatos/as hasta pasados los 9 meses de edad, pues los anticuerpos maternos circulantes en el /la niño/a interfieren con el resultado. En los últimos años, se han desarrollado métodos de detección del parásito por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y sus variantes. Estos métodos resultan muy sensibles y específicos pero requieren de una infraestructura, equipamiento y recursos humanos complejos por lo que sólo algunos centros de salud y/o de investigación están en condiciones de aplicarlos.

En Argentina, la ley 26.281 - de Prevención y control del Chagas establece que es obligatoria *la realización de las pruebas diagnósticas en los/as recién nacidos/as, hijos/as de madres infectadas, hasta el primer año de vida*. A causa de la falta de un diagnóstico suficientemente sensible, específico y posible de realizar en toda sala de atención al/a recién nacido/a, el Ministerio de Salud junto a Unicef han diseñado un algoritmo para neonatos/as en tres pasos:

1- Al momento del nacimiento, por observación del parásito en sangre (con una sensibilidad aproximadamente del 50%, muy dependiente del/a operador/a).

2- A los 3 - 6 meses, con el mismo procedimiento.

3- A partir de los 9 meses de edad, por métodos serológicos (con una sensibilidad entre el 89 y el 95% según el kit utilizado), donde los anticuerpos circulantes maternos ya no interfieren con el resultado de la prueba.

La aplicación del algoritmo implica que al menos la mitad de los casos de Chagas congénito no son confirmados hasta pasados los 9 meses de edad, perdiéndose un valioso tiempo para el tratamiento precoz. Un riesgo adicional, es la inconcurrencia de los/as pacientes al control, perdiéndose la posibilidad de completar el diagnóstico e iniciar el tratamiento.

El objetivo de este trabajo consistió en diseñar un test sensible y específico y a la vez simple e inclusivo (para todo tipo de condición) que permita el diagnóstico precoz del Chagas en neonatos/as.

Para ello seleccionamos una plataforma tecnológica de amplificación molecular isotérmica, aplicada con éxito en diversos países para detectar distintos agentes infecciosos. Los pasos de investigación y desarrollo incluyeron 3 etapas:

Etapa 1: Selección de secuencias blanco y diseño de primers, mediante el análisis bioinformático y la aplicación de un software específico para esta tecnología.

Etapa 2: Puesta a punto de la reacción in vitro. Se efectuaron pruebas para ajustar las condiciones de reacción; la sensibilidad en diversos tipos de muestra dispensadas en distintos soportes; y la especificidad, utilizando distintas cepas de *T. cruzi*, otros parásitos filogenéticamente emparentados, células humanas y células no relacionadas al parásito ni al hospedador. Adicionalmente se realizaron estudios en muestras de sangre positivas y negativas para Chagas certificadas por el Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatala Chaben”.

Etapa 3: Adecuación del test a condiciones “*Point of care*” (POC), es decir a todo tipo de condición de campo (de equipamiento, infraestructura, de recursos humanos, etc.). Para ello, trabajamos en tres puntos clave: la obtención del templado molecular a partir de una muestra de sangre, las condiciones de amplificación y la simplificación del método de lectura.

El resultado de este desarrollo concluyó en un test que incluye los siguientes pasos:

I- Obtener la muestra: una gota de sangre obtenida mediante punción y dispensada en un disco de papel (no se requiere extraccionista).

II- Sembrar la muestra en la mezcla de reacción.

III- Incubar 40 minutos a 65°C, en cualquier tipo de dispositivo o baño térmico.

IV- Revelar el resultado, mediante el sistema de tiras reactivas “*lateral flow lipsticks*” (similar a los tests de embarazo comerciales).

Esta experiencia nos anima a proponer próximos desarrollos para otras enfermedades infecciosas.