

VI WORKSHOP INTERNACIONAL. “TESTES DIAGNOSTICOS ACESSIVEIS E
QUALIDADE ASSEGURADA PARA PROGRAMAS DE SAÚDE PÚBLICA”

Uso de Pruebas Rápidas como punto de partida para el Diagnóstico de Chagas Congénito EXPERIENCIA DE BOLIVIA

Dr. Freddy Tinajeros
COORDINADOR DE PROYECTOS
INVESTIGADOR ASOCIADO
UNIVERSIDAD JOHN HOPKINS-PRISMA



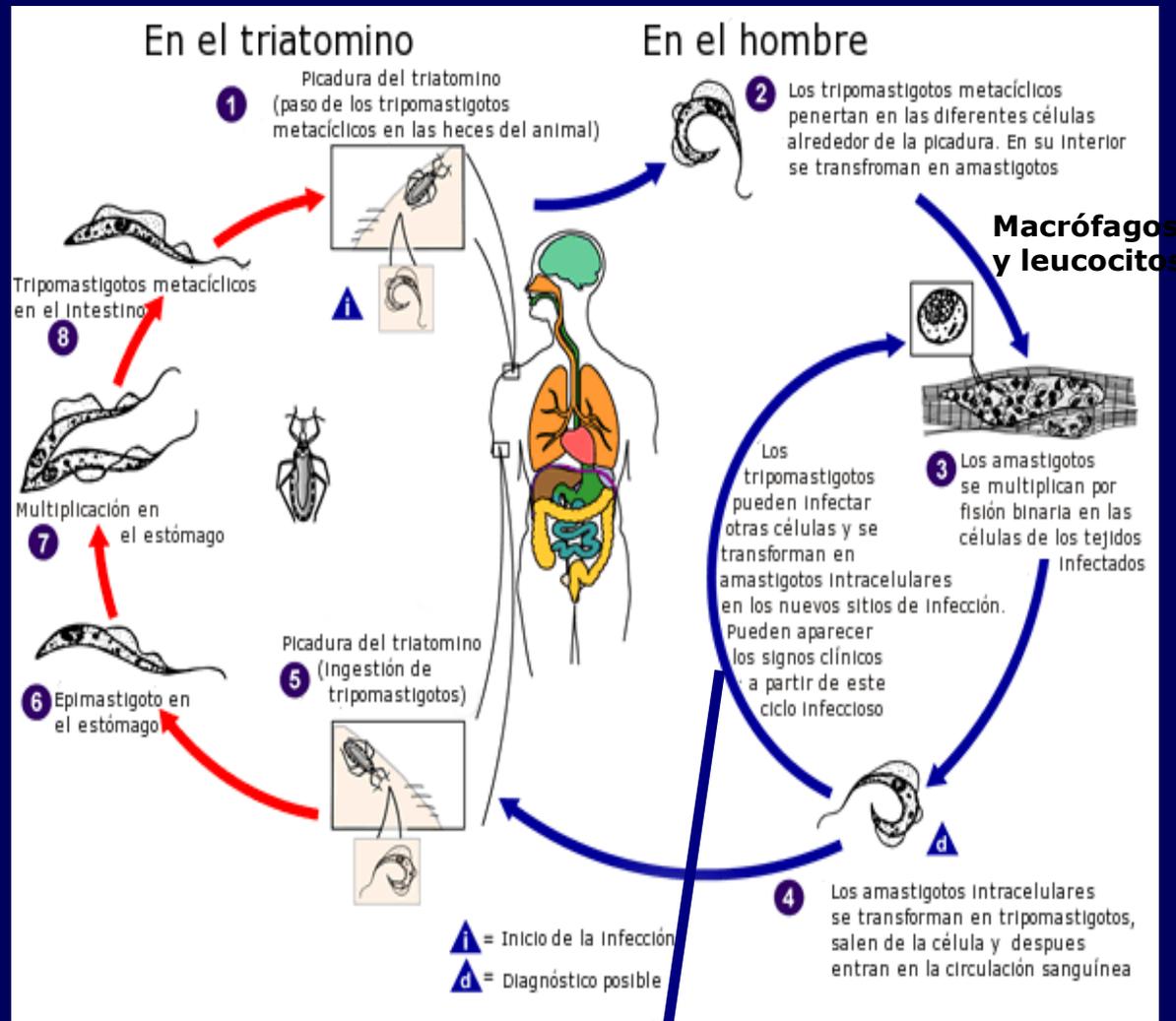
Enfermedad de Chagas

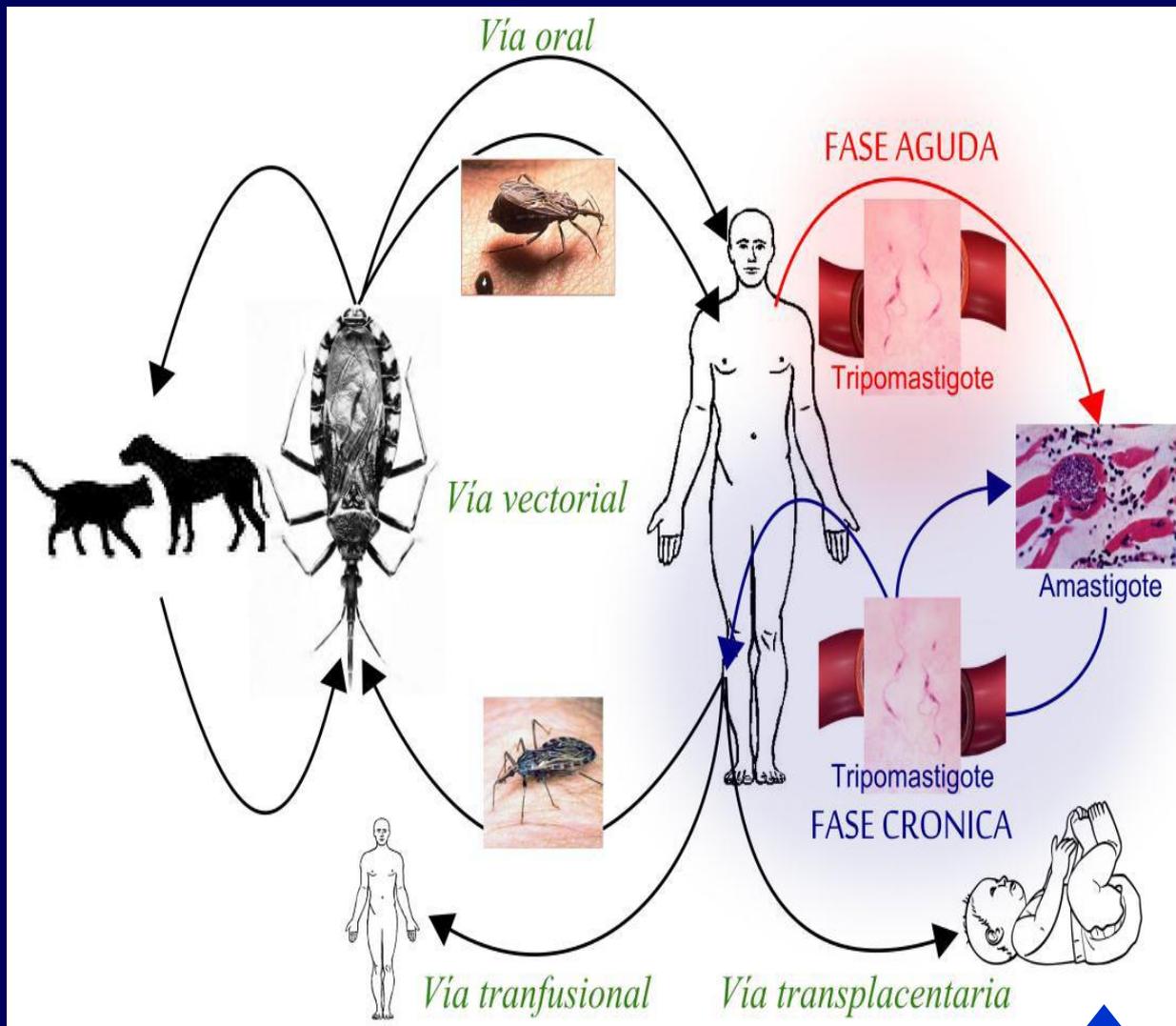
La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana, es una infección causada por un parásito denominado Trypanosoma cruzi, y es llamada así, por su descubridor, el médico brasileiro Carlos Chagas.

COMO SE TRANSMITE:

- **PICADURA:** por la picadura de la chinche, chince picuda, vinchuca, marimacha o timbuku, que al picar defeca en la piel y genera escozor. Al rascar el parásito penetra y la persona es contaminada
- **PERINATAL:** De madre a hijo en el embarazo si la mujer tiene la enfermedad
- **TRANSFUSIÓN:** Por transfusión de sangre u órganos contaminados
- **ALIMENTOS:** Por la ingestión de alimentos contaminados con heces de la vinchuca

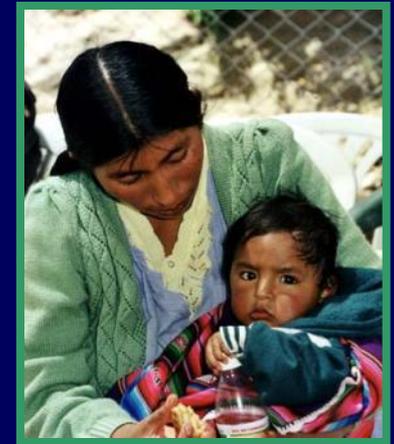
Ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi*





Transmisión de *T. cruzi* no vectorial

- Congénito
- Transfusión de sangre infectada
- Transplante de órgano de donante infectado
- Accidentes del laboratorio
- Oral
 - Brotes de Chagas aguda en Brasil y Venezuela vinculados a jugos y frutas contaminadas
 - Puede ser ruta importante para animales que comen los vectores





1-2 semanas

Infección por *T. cruzi*

Fase aguda



1-2 semanas

Infección por *T. cruzi*



Fase aguda

- < 1% diagnosticado, la mayoría tiene síntomas no específicos y leves
- Parasitemia alta, detectable por microscopía en sangre periférica
- A veces, signo en el lugar de inoculación
 - Señal de Romaña (hinchazón palpebral) o chagoma (absceso en piel)
- Fiebre, malestar general, hepatoesplenomegalia, linfocitosis
- Complicaciones poco frecuente pero grave: meningoencefalitis, miocarditis
 - Llevan riesgo alta de mortalidad





1-2 semanas

Infección por *T. cruzi*

Fase aguda

~8 semanas

Fase crónica

- Síntomas agudas resuelven sin tratamiento
- Parasitemia baja hasta que no se detecta por microscopía
 - Diagnóstico basado en serología de IgG
- Puede infectar a vectores, por transfusión, de madre al recién nacido
- Sin tratamiento la infección dura toda la vida



1-2 semanas

Infección por *T. cruzi*

Fase aguda

~8 semanas

Fase crónica

Forma indeterminada

Ni signos ni síntomas de la enfermedad

70 - 80% seguirán
sin síntomas
durante toda la vida



1-2 semanas

Infección por *T. cruzi*

Fase aguda

~8 semanas

Fase crónica

Forma indeterminada

Ni signos ni síntomas de la enfermedad

20 - 30% progresarán
durante años - décadas

70 - 80% seguirán
sin síntomas
durante toda la vida

*Puede reactivar en condiciones
de inmunosupresión*

Formas determinadas

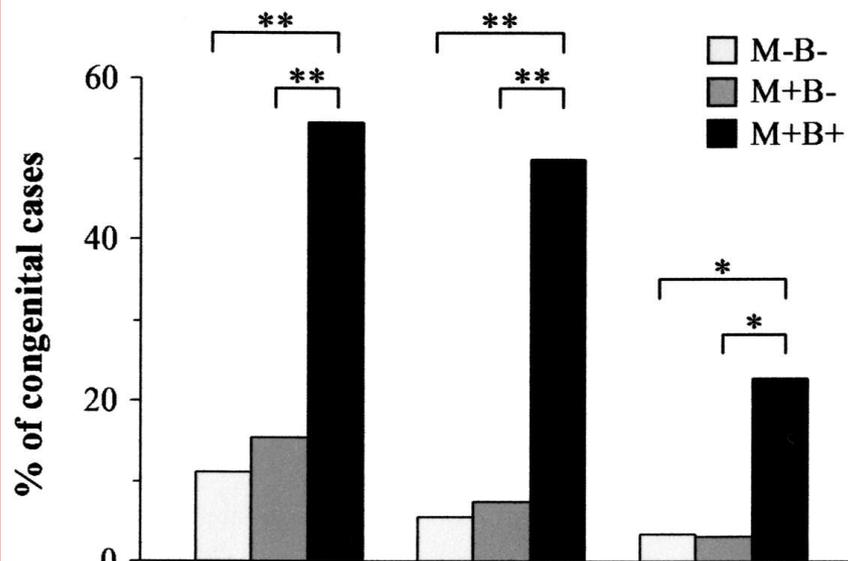
- Cardiopatía chagásica y/o
- Forma digestiva

Infección congénita por *T. cruzi*

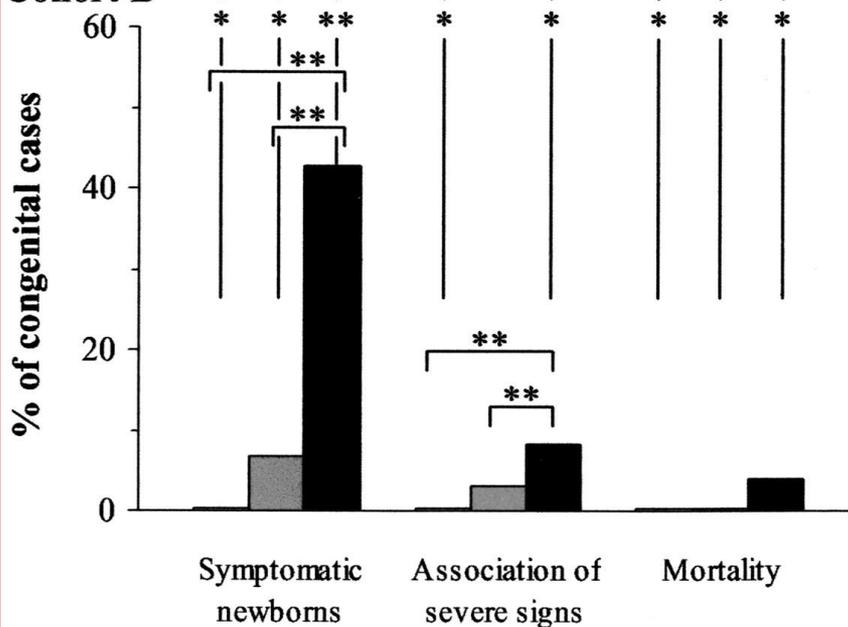
- Infección aguda por *T. cruzi* en el recién nacido
- El cuadro clínico usualmente es leve o asintomático
- **Raras veces complicaciones severa:** meningoencefalitis, miocarditis, síndrome de dificultad respiratoria
- Diagnostico temprano requiere demostración del parásito
 - Micro-método: Microscopía de sangre concentrada
 - PCR en laboratorios avanzados
 - Parasitemia aumenta después del nacimiento
 - IgG materna hasta los 9 meses



Cohort A



Cohort B



La severidad clínica esta bajando a través del tiempo

En cohortes de bebés nacidos en Cochabamba 1992-1994 vs 1999-2001

- 45% vs 5% con 1-m Apgar < 7
- 50% vs 15% peso < 2500 g
- 14% vs 2% mortalidad
- Relacionado a mejoramiento socioeconómico, atención prenatal mejor, disminución de reinfecciones maternas?

Estudios de Chagas Congénito

- 21 estudios prospectivos 1990-2014
 - Argentina (8), Bolivia (7), Brasil (1), Chile (1), Perú (1)
México (2), El Salvador (1)
 - 8 usaron solo micro-método en muestras de nacimiento
 - 11 incluyeron muestras de 0 o 1 mes de edad y además las de 8-12 meses
- Probablemente mucha variación en grado de detección
 - Sensibilidad del micro-método 28% a 50%
 - PCR solo en 7 estudios
 - Pérdida durante el seguimiento a los 8-12 meses 42 - 82%

Mallimaci 2010; Bisio 2011; Blanco 2000; De Rissio 2010; de Rissio 2009; Mora 2005; Bua 2013; Arcavi 1993; Bern 2009; Kaplinski 2015; Salas Clavijo 2012; Torrico 2004 (2 cohorts); Salas 2007; Brutus 2008; Sasagawa 2015; Cardoso 2012; Olivera Mar 2006; Nisida 1999; Apt 2013; Mendoza Ticona 2005

Prevalencia materna de *T. cruzi*

- Promedio: 8.5% (0.7 to 42.2%)
 - Argentina (3): 5.5% (3.8-8.5)
 - Bolivia (7): 27.6% (17.3-42.2)
 - México/El Salvador (3): 4.0% (3.8-7.3)
 - Chile (1): 3.4%
- La prevalencia esta bajando a través del tiempo
 - En Santa Cruz, Bolivia: 50% en los 1980s, 29% en 2006-07, 18.7% en 2010-2013
- Prevalencia mayor en mujeres mayores
 - Prevalencia refleja incidencia acumulada
 - También refleja menos exposición en mujeres jóvenes por los programas de control vectorial

Tasas de transmisión congénita

- Promedio: 5.1% (rango 0-11.3%)
 - 8 estudios con muestras 0 mes, sin PCR: 5.1%
 - 6 estudios con muestras a 0 y 8-12 meses, con PCR: 6.9%
- Consistente con meta-análisis

Table 2. Results of subgroup and sensitivity analyses

	No. of studies	Pooled congenital infection rate (95% CI)	Q statistic (<i>P</i> -value)	<i>I</i> ²	Random effects weight
Method of diagnosis					
Direct parasitology and/or serology	22	4.6% (3.4–5.7%)	27.8 (<i>P</i> < 0.01)	24.5	84.6
PCR	9	6.0% (4.3–7.7%)	8.4 (<i>P</i> = 0.27)	4.9	56.3
Mixed/other	27	4.5% (3.4–5.5%)	22.3 (<i>P</i> = 0.06)	0	93.5
Endemicity of country					
Endemic	30	5.0% (4.0–6.0%)	30.9 (<i>P</i> < 0.01)	6.2	128.4
Non-endemic	21	2.7% (1.9–3.5%)	16.7 (<i>P</i> = 0.86)	0	56.4
Sensitivity analysis					
Excluding studies with zero congenital infections	38	4.8% (4.0–5.7%)	39.8 (<i>P</i> < 0.01)	7.1	153.4

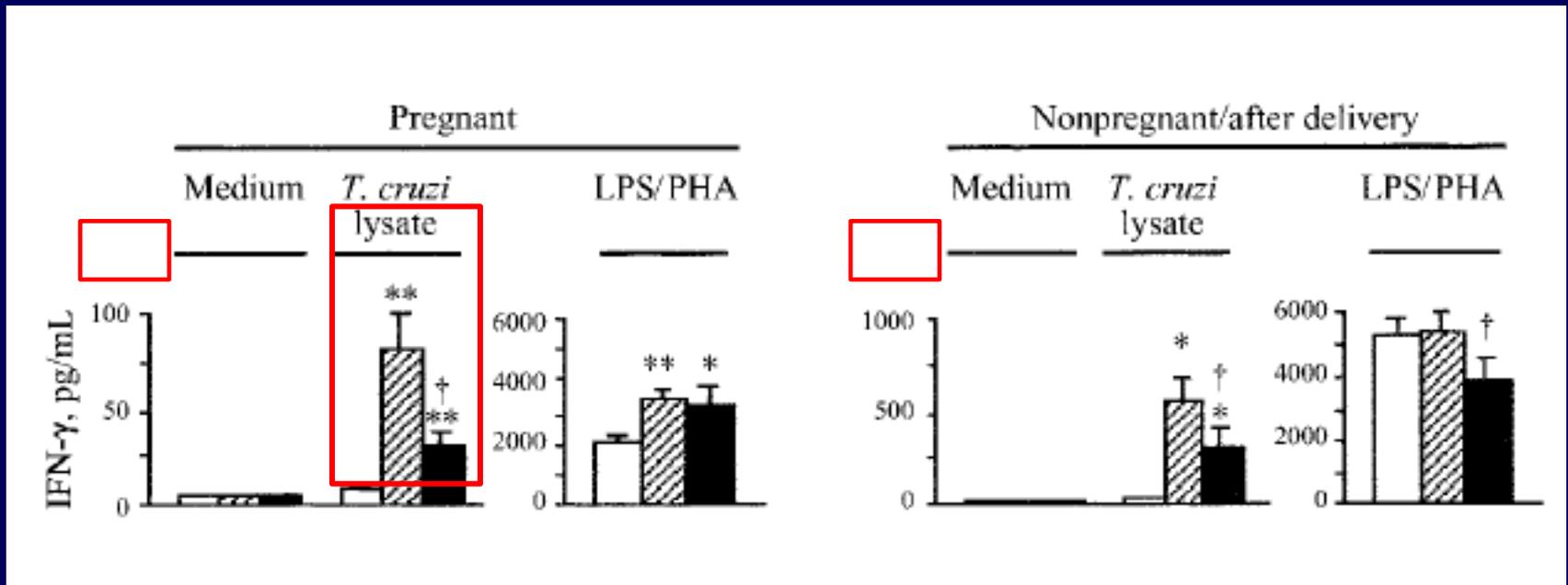
Influencia de genotipo de *T. cruzi*

- Modelos experimentales en animales sugieren que algunas sepas tienen mas riesgo que otras, pero los datos humanos no muestran diferencias
- Distribución de DTU en infecciones congénitas es igual a la distribución en adultos en el mismo lugar
 - La mayoría de los datos son de Argentina/Bolivia y muestran predominantemente Tc V, con algunos Tc I, II, VI
- Tasa de transmisión por área geográfica
 - Argentina/Bolivia (15 estudios; Tc V presumido) 5.7%
 - México/El Salvador (3 estudios; Tc I presumido) 3.1%
 - Diferencias en metodología impide la comparación

Determinantes de transmisión vertical

- Carga parasitaria de la madre es la determinante más inmediata y fuerte de riesgo de transmisión
 - Basado en PCR cuantitativo o convencional, o hemocultivo
 - Hallazgos consistentes en varios estudios
- Otros factores probablemente funcionan a través de sus efectos en la carga parasitaria
 - Mujeres con infección aguda o con co-infección por VIH
 - Edad menor
 - Respuesta inmunológica materna

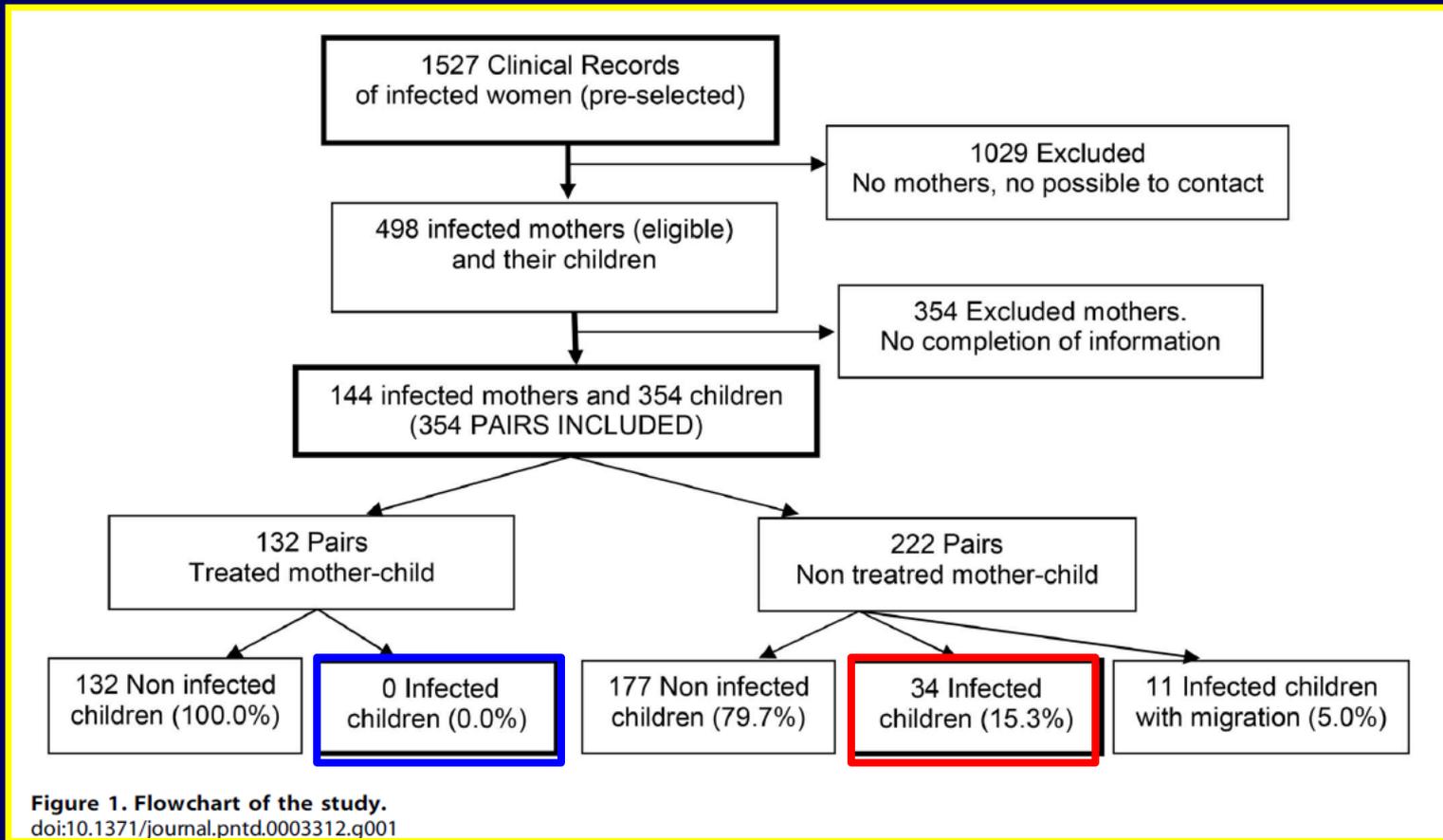
Madres de recién nacidos infectados tienen respuesta menor de interferón- γ comparado con madres infectadas no transmisoras



- Uninfected mothers
- Infected mothers of uninfected infants
- Infected mothers of infected infants

Respuesta de IFN- γ en gestantes es casi 10 veces menor que en mujeres no gestantes

Mujeres tratadas antes del embarazo tienen mucho menos probabilidad de transmitir a sus niños



RR 0.04 [95% CI 0.012, 0.166]

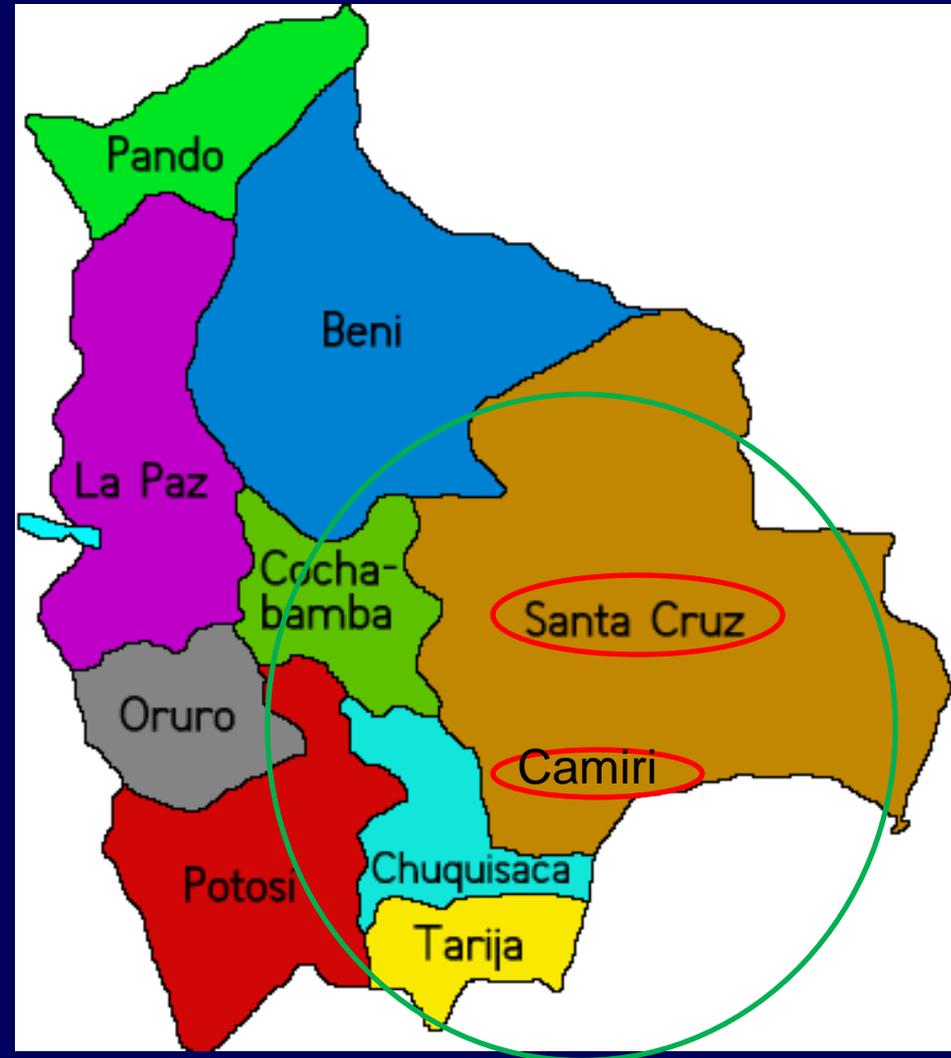
Lugares del estudio

Objetivos del estudio

- Evaluar tasa y factores de riesgo para transmisión congénita
- Evaluar pruebas alternativas para diagnóstico en recién nacidos

Procedimientos

- Prueba rápida en madres con confirmación por serología convencional
- Examinación de recién nacidos de madres infectadas a los 0, 1, and 9 meses de edad



Mujeres gestantes acudiendo al hospital para el parto

Prueba rápida +

Prueba rápida —

Muestras de sangre y orina del RN para micrométodo, PCR, Q-PCR y TESA Blot

Estado materno confirmado por 2 pruebas serológicas convencionales

Seguimiento activo de recién nacidos de madres seropositivas: muestras (0, 1 y 9 m)

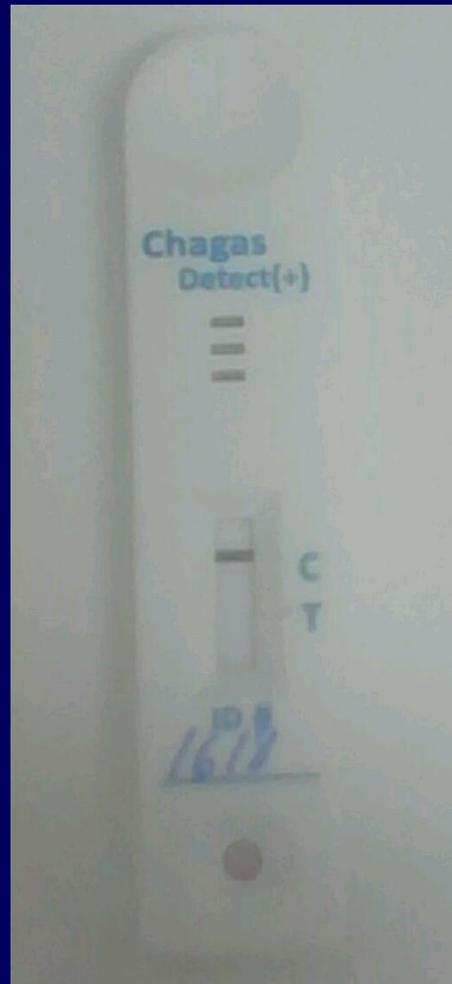
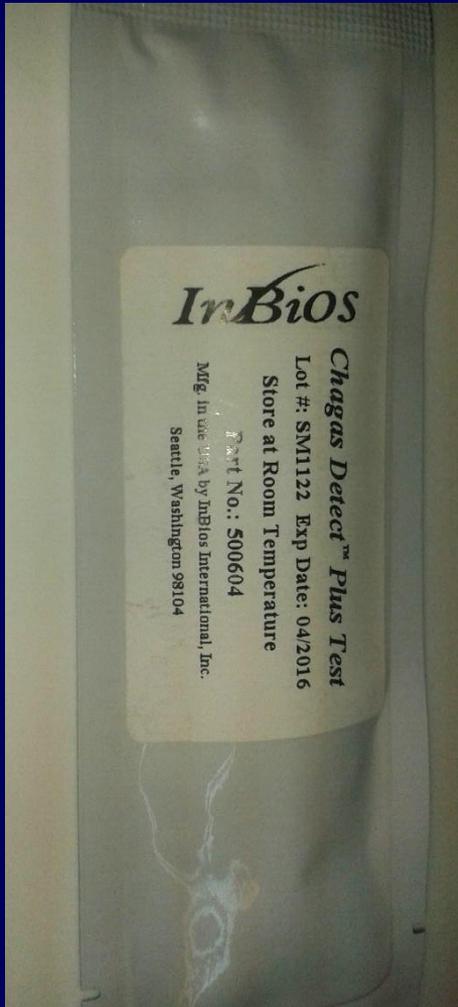
Infección congénita diagnosticada por micrométodo, o por serología a los 9 meses: recién nacido referido inmediatamente para tto.

Estado final del niño definido por consenso entre ensayos múltiples

Prueba Rápida de Chagas

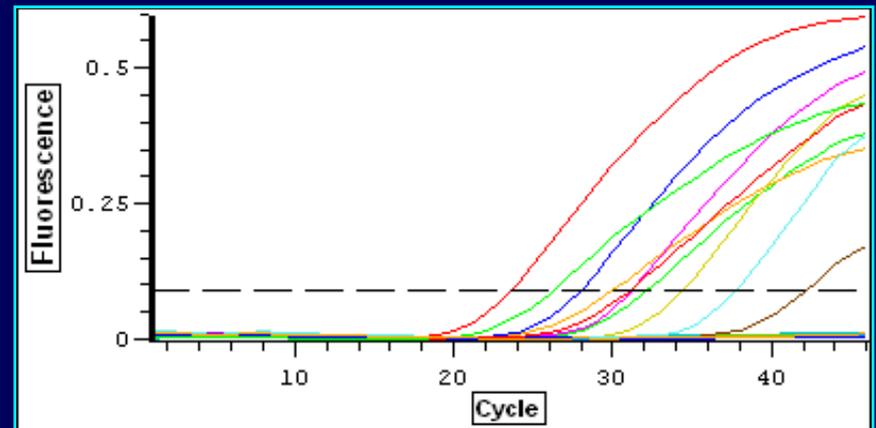
- Realizado en el Laboratorio del Hospital de la Mujer a todas las embarazadas en trabajo de parto
- Fue el punto de partida para identificar a los posibles RN con Chagas
- Pruebas rápidas Inbios diagnostic Plus Test

Pruebas Rápidas para Chagas



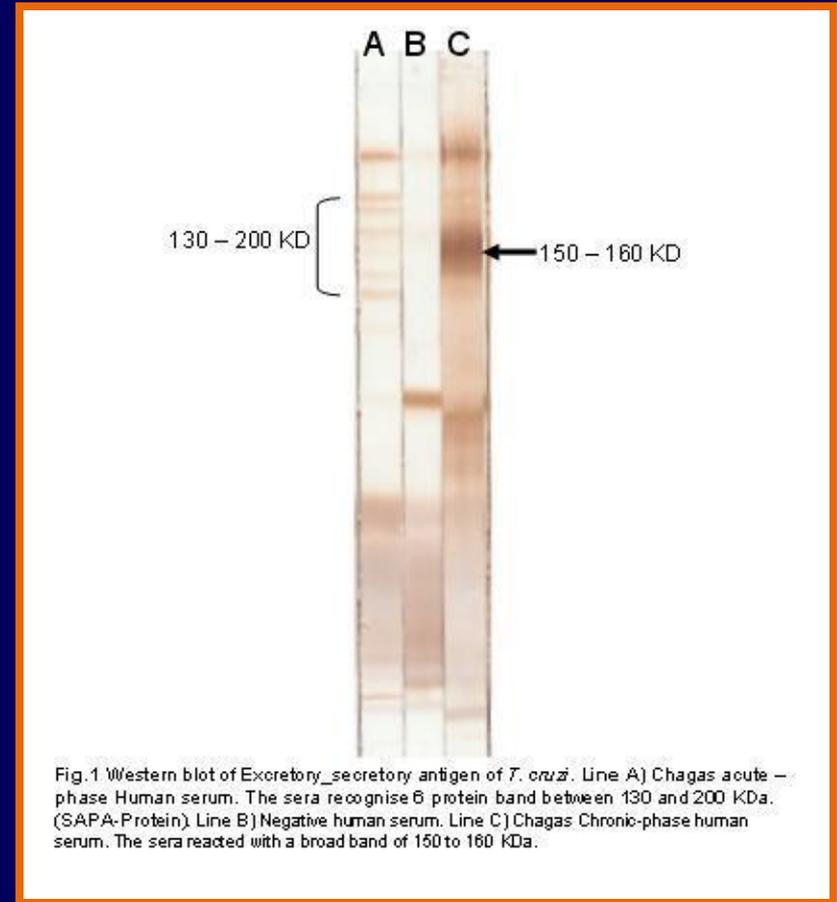
Ensayos moleculares para *T. cruzi*

- Hecho en nuestro lab en Lima
- Sangre de la madre y sangre – orina del recién nacido
- PCR cuantitativo (Piron et al 2007)
 - Primers Tcz1/Tcz2
 - Labeled with 5' FAM
 - Taqman human RNase P detection reagent



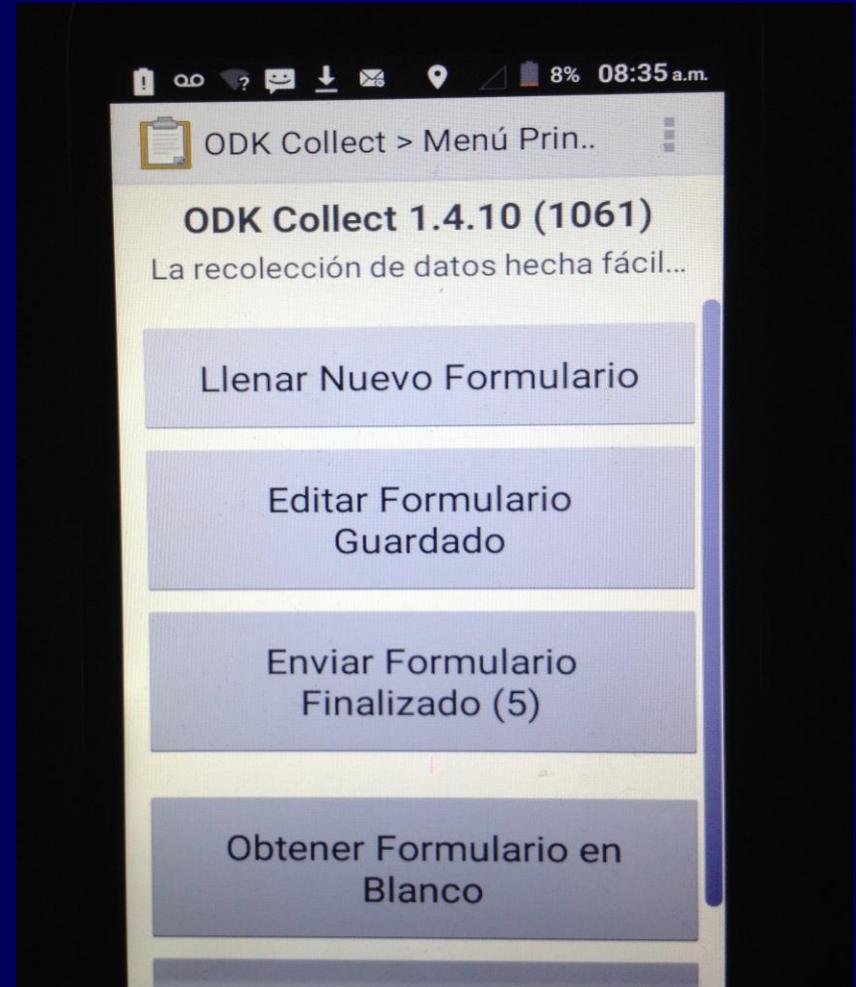
Prueba alternativa: IgM TESA-blot

- IgG blot en infección crónica muestra banda ancha a 150-160 kD
- IgM blot en infección aguda o congénita muestra bandas SAPA
- Requiere lab con experiencia y validación cuidadosa

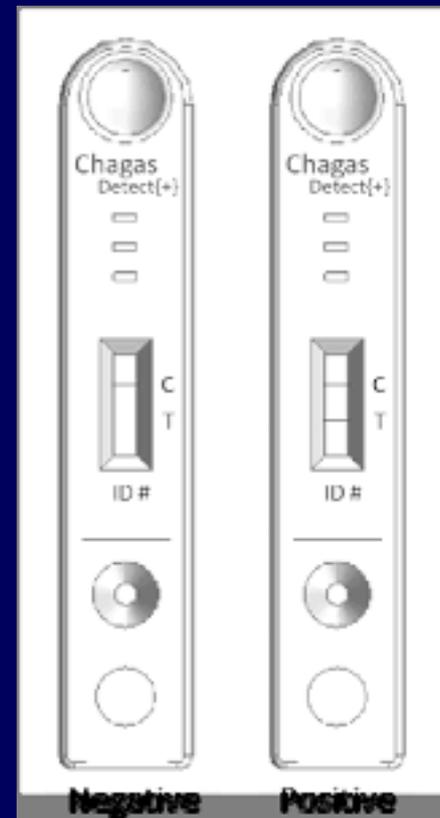


Cuestionario de reclutamiento realizado con celulares

- Datos generales
- Sociodemográficos
- Datos de historia de vivienda
- Datos gineco-obstétricos de la madre
- Datos del RN, apgar, peso, talla, perímetro cefálico, hepatomegalia, esplenomegalia y otras enfermedades
- Resultados de laboratorio de la madre y el niño
- Control RN, a 1 mes y 9 meses



Resultados



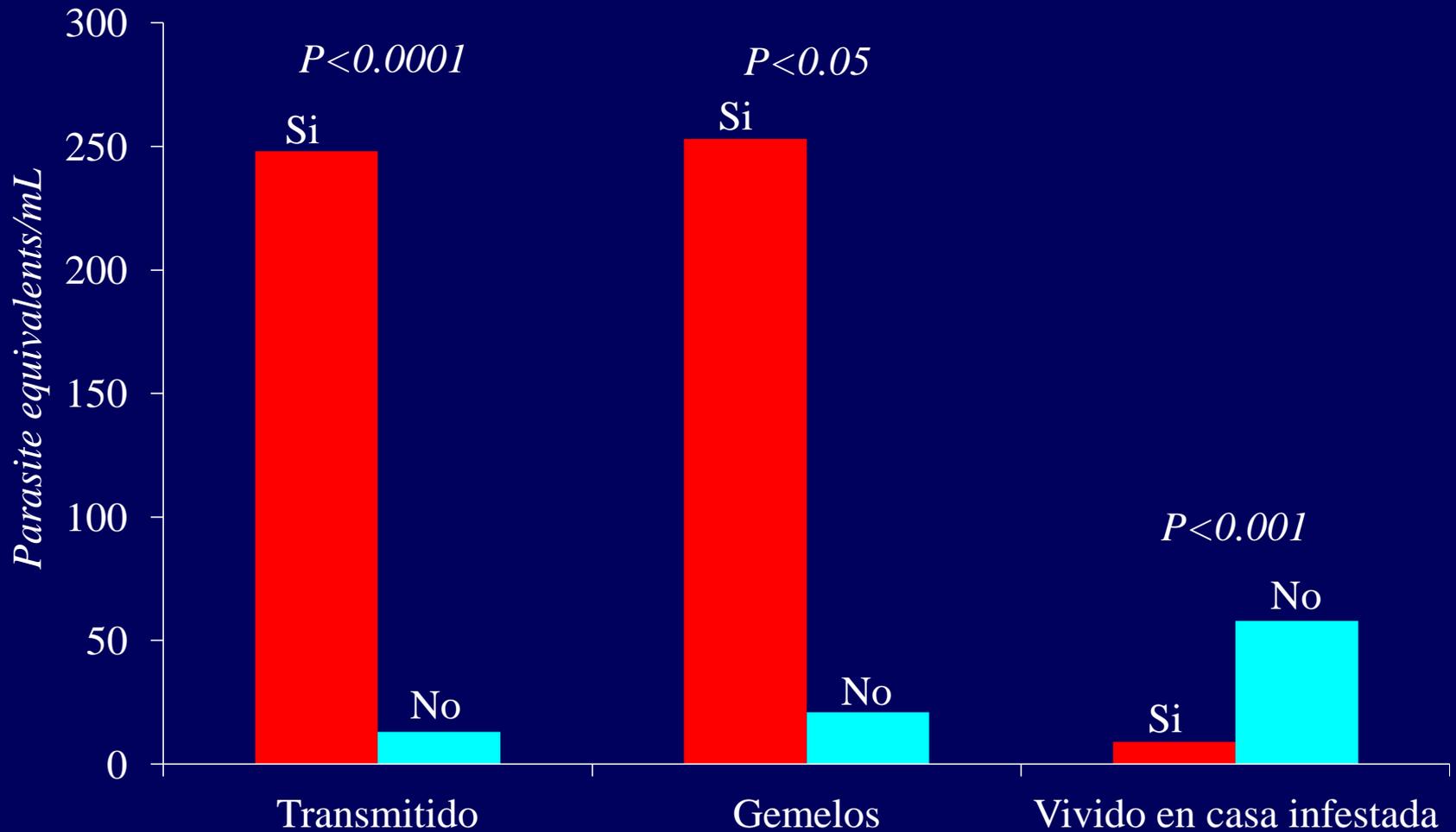
Estado clínico de los recién nacidos infectados

- Ninguno con cuadro clínico severo
 - Ninguno con hepato o esplenomegalia
 - Puntaje de Apgar 1 minuto y 5 minutos igual para infectados y no infectados (promedio 8 y 9)
- Cuadros leves en 26% de bebés infectados
 - Peso <2500 en 22% de infectados vs 5.7% no infectados (excluyendo gemelos; $p < 0.01$)
 - 18% de los bebés infectados fueron hospitalizados vs 9% de los no infectados ($p = 0.08$)
 - Entre los infectados, los con peso bajo y/o hospitalización fueron más probables de tener micro-método positivo o en sangre del cordón o en mx de 1 mes (70% vs 21%; $p < 0.05$)

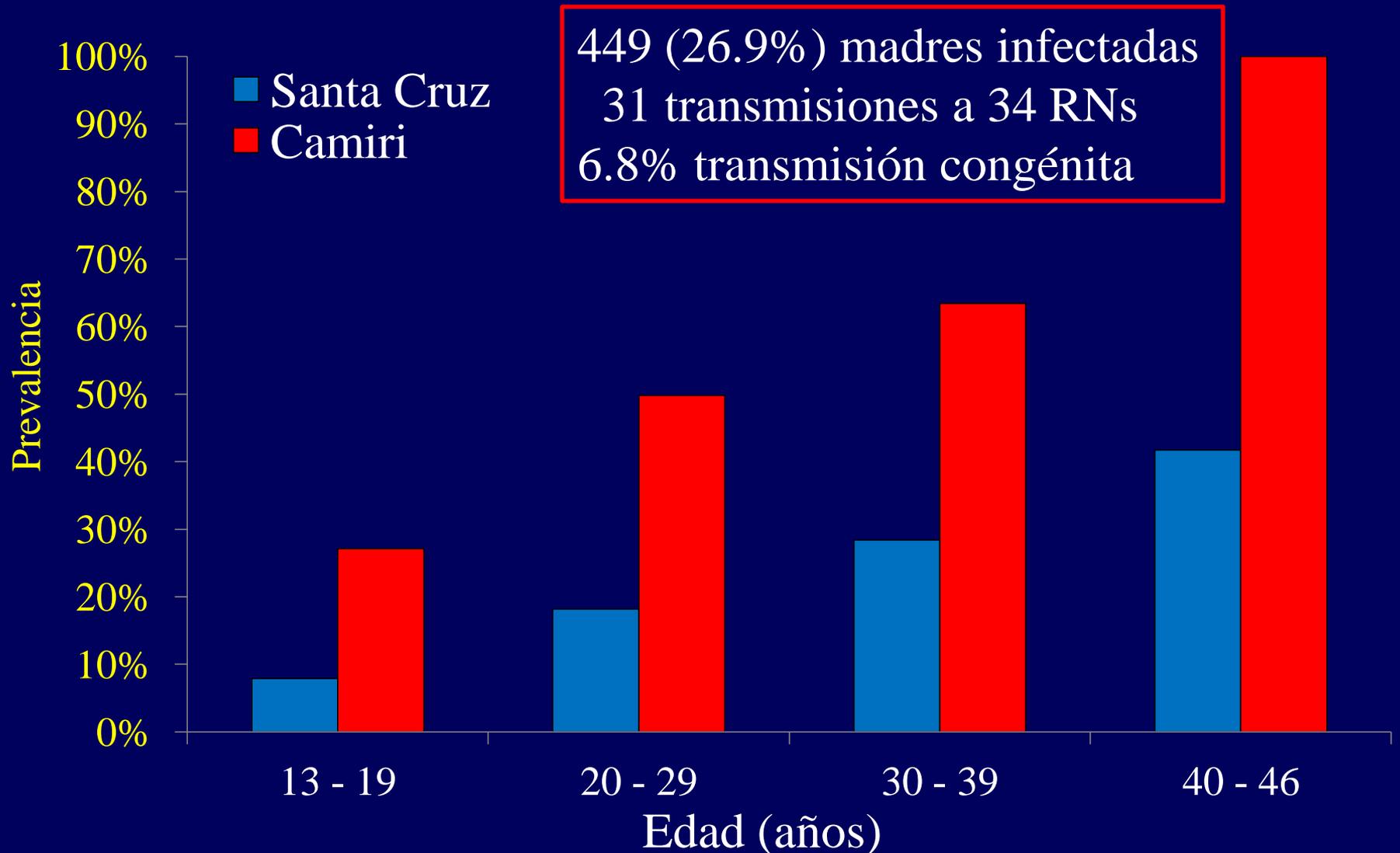
Factores de riesgo para transmisión congénita

Factor	Transmitted <i>T. cruzi</i> N=31	Did not transmit N=418	P
Positive results by PCR	13 (100)	44 (41.9)	<0.0001
Twin birth	3 (9.7)	8 (1.9)	0.04
Ever lived in an infested house	11 (35.5)	230 (55.2)	0.04
Lives in infested house now	4 (12.9)	98 (23.4)	0.26
Median [IQR] in years			
Age in years	24.0 [20.1, 30.2]	26.8 [22.0, 34.0]	0.04
Parasite equivalents/ <u>mL</u>	62.0 [25.8, 204.8]	0.05 [0, 29.6]	<0.0001
Years living in infested house	0 [0,15]	6.5 [0,20]	0.02

Carga parasitaria materna



Prevalencia de infección materna por *T. cruzi*



RN	Micro-método		IgM TESA		PCR		
	0 m	1m	0 m	1m	0 m	tejido umb	1m
1	0	0	0	0	0	0	0
2	0	1	1	1	1	1	1
3	0	0	0	0	1	1	1
4	sin mx	0	sin mx	1	sin mx	sin mx	1
5	0	1	0	0	0	1	1
6	0	1	1	0	1	1	1
7	0	sin mx	1	sin mx	1	1	sin mx
8	sin mx	1	sin mx		sin mx	sin mx	1
9	0	sin mx	1	sin mx	1	1	sin mx
10	0	0	0	0	0	0	0
11	1	pos tto	1	1	1	1	0
12	1	pos tto	1	1	1	1	0
13	0	1	1	1	1	1	0
14	0	0	1	1	1	1	1
15	0	sin mx	1	sin mx	1	7	sin mx
16	0	0	0	0	0	0	0
17	0	sin mx	1	sin mx	1	1	sin mx
18	0	0	1	1	1	1	1
19	0	0	1	1	1	1	1
20	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	1	0	0	1
22	0	0	1	1	1	0	0
23	0	0	1	0	1	0	1
24	1	pos tto	1	0	1	1	1
25	0	0	0	1	0	1	1
26	0	0	1	1	0	1	1
27	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	1	0	1	1	1
29	0	1	0	1	1	1	1
30	1	pos tto	1	1	1	1	0
31	0	0	1	1	1	1	sin mx
32	0	0	0	1	1	0	1
33	0	1	1	0	1	1	sin mx
34	0	0	0	0	0	sin mx	1
Sensibilidad	12.5%	26.9%	62.5%	55.2%	68.8%	67.7%	64.3%
	32.4%		75.8%		85.3%		

Evaluación de las Pruebas Rápidas InBios Chagas Detect Plus en muestras de dos establecimientos de salud en Bolivia

Tipo de muestra	Sensibilidad, 95% CI	Especificidad, 95% CI
Sangre total	96.2% (92.7-98.4)	98.8% (95.9-99.9)
Suero	99.3% (97.5-99.9)	96.9% (94.2-98.6)

Conclusiones

- La prueba rápida de Chagas (Inbios) fue muy útil para identificar a las mujeres parturientas con Chagas y dar seguimiento a sus recién nacidos
- La prevalencia de Chagas en mujeres parturientas fue alrededor del 20%
- Tasa de transmisión 6.8%, consistente con la literatura
- Diagnostico problemático
 - Requiere muestras múltiples
 - Micro-método solo tenía sensibilidad cumulativa de 32%, pero 70% en los con bajo peso y/o hospitalización
 - IgM TESA-blot, PCR tienen sensibilidad mejor pero no son fáciles de implementar en laboratorios de recursos limitados

Conclusiones (cont. 1)

- Exposición al vector asociado a mayor riesgo, pero con carga parasitaria y transmisión congénita menor
- Es necesario contar con métodos de diagnóstico rápidos y de alta sensibilidad que permitan el tratamiento oportuno
- Se debe mejorar el acceso al diagnóstico de Chagas de calidad en el sistema de salud
- Un resultado negativo en el recién nacido no implica una negatividad total, se debe dar seguimiento al mes, 6 y 9 meses hasta demostrar que es negativo el bebé

Conclusiones (cont. 2)

- **Hipótesis:** la respuesta inflamatoria aumenta el daño cardiaco pero ayuda en el control de parasitemia durante el embarazo
- Es necesario mejorar el acceso a pruebas rápidas en el sistema de salud boliviano
- Se debe mejorar el acceso a través de la red de laboratorios a pruebas de amplificación del DNA

Agradecimientos

Robert Gilman

Caryn Bern

Edith Hinojosa

Margot Ramirez

Eliana Saenza

Programa Regional de Chagas Santa Cruz

Hospital San Juan de Dios

Hospital Boliviano-Japonés

Hospital de la Mujer Percy Boland

Centro de Salud de Camiri

*Funding: NIH R01-AI087776,
NIH D43 TW006581*

Obrigado

Freddy Tinajeros Guzmán, MPH, PhD
ftinajeros@gmail.com