



**DESARROLLO DE LÁMINAS PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE LA  
COLORACION DE GIEMSA Y ROMANOWSKY MODIFICADO  
UTILIZADAS EN EL DIAGNOSTICO DIRECTO DE *Trypanosoma cruzi*.**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLINICO  
TRABAJO DE GRADO  
BOGOTÁ**



**DESARROLLO DE LÁMINAS PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE LA  
COLORACION DE GIEMSA Y ROMANOWSKY MODIFICADO  
UTILIZADAS EN EL DIAGNOSTICO DIRECTO DE *Trypanosoma cruzi*.**

**JAIRO IVAN ORTIZ CARREÑO**

**NELSON ARTURO SALAZAR BUITRAGO M.Sc., Ph.D.**  
Asesor Interno

**DIANA MARTHA RAQUEL TAPIAS SALDAÑA**  
Asesora Externa

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
TRABAJO DE GRADO  
BOGOTA**

## DEDICATORIA

*Primero dedico este trabajo a Dios que con su luz siempre me ha iluminado en mi camino, a mi Madre Rosalba y mi Padre Orlando, que con su amor y su comprensión incomparable me han apoyado en este largo recorrido, son la base de mi vida y me han aportado lo mejor de sus vidas*

*A mi hermana Yeimy que con su amor es ejemplo en mi vida de mucha perseverancia y de ternura.*

*A Andrés mi hermano mi mejor amigo, mi ejemplo a seguir, siempre me apoyo en todo y sin el especialmente no se podría haber realizado este trabajo, "aquí está tu pequeño guerrero"*

*A mi familia y mis seres queridos a Encuentro Juvenil Bogotá que siempre me han apoyado en la decisión de conocerme y amarme a mí mismo.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco principalmente a Dios por darme la vida y de haberme dado muchas bendiciones a lo largo del camino. A mi padre, madre y mis hermanos, por siempre estar conmigo y de apoyarme en todo lo que necesito en mi vida.

Además, agradezco a mi universidad, mi *alma mater* y a los diferentes docentes quienes con el trascurso del tiempo siempre han dado lo mejor de ellos para que sea un excelente profesional. A la Industria Nacional de Microbiología, en especial a la doctora Diana Tapias Saldaña por haber confiado en mí, y permitirme desarrollarme integralmente como profesional y persona.

Y en especial a mis asesores de tesis quienes fueron parte fundamental para el desarrollo y finalización de este gran trabajo.

## TABLA DE CONTENIDO

INDICE DE TABLAS .....	9
INDICE DE FIGURAS .....	10
RESUMEN .....	11
INTRODUCCIÓN .....	13
1. ANTECEDENTES.....	16
2. MARCO TEÓRICO .....	18
2.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	18
2.1.1. Generalidades .....	18
2.1.2 Epidemiología .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
2.1.2.1 Epidemiología en América .....	22
2.1.2.2 Epidemiología en Colombia .....	23
2.1.3 Diagnostico.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
2.1.4 Tratamiento .....	26
2.1.5. Técnicas .....	28
3. DISEÑO METODOLÓGICO .....	32
3.1 UNIVERSO, POBLACION Y MUESTRA .....	32
3.2 RECOLECCION DE INFORMACION CORRESPONDIENTE A LA NORMATIVIDAD VIGENTE .....	32
3.3 OBTENCION DE AISLAMIENTOS DE PARASITOS.....	33
3.4 AISLAMIENTOS DE <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	33
3.5 CONCENTRACIONES DE <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	34
3.6 MUESTRAS CLINICAS UTILIZADAS.....	34
3.7 ESTANDARIZACION DEL PROCESO DE PRODUCCION .....	34
3.8 PRUEBAS DE ESTABILIDAD DEL PRODUCTO .....	36
4. RESULTADOS.....	37
4.1 VOLUMEN IDEAL DE LA MUESTRA EN LA LAMINA PORTAOBJETOS ..	37
4.2 ELECCION DE LA CONCENTRACION DEL PARASITO .....	38
4.3 INFORMACION DEL CONTROL DE CALIDAD .....	38
4.4 PROCESO DE PRODUCCION DEL PRODUCTO .....	39
4.5 PRUEBAS DE ESTABILIDAD DEL PRODUCTO .....	45

4.6 PRESENTACION Y CARACTERISTICAS DEL PRODUCTO .....	46
5. DISCUSION.....	47
6. CONCLUSIONES .....	50
7. RECOMENDACIONES.....	51
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	52
9. ANEXOS.....	57

## INDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Concentraciones del parasito requeridas	32
<b>Tabla 2.</b> Resultados de volúmenes de muestra en la lámina portaobjetos	35
<b>Tabla 3.</b> Estandarización de concentración ideal con respecto al volumen de muestra y el número de parásitos por campo microscópico	36
<b>Tabla 4.</b> Evaluación microscópica de coloración	42
<b>Tabla 5.</b> Resultados pruebas de estabilidad del producto	44

## INDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
<b>Figura 2.</b> Enfermedad de Chagas en América	21
<b>Figura 3.</b> Mortalidad de casos confirmados de Enfermedad de Chagas	22
<b>Figura 4.</b> Epidemiología de Enfermedad de Chagas, Porcentajes de confirmación de casos en fase crónica	23
<b>Figura 5.</b> Métodos de diagnóstico de la enfermedad de Chagas	23
<b>Figura 6.</b> Control de calidad en coloración para gota gruesa y frotis de sangre periférica	31
<b>Figura 7.</b> Posibles formas de distribución de muestra en la lámina portaobjetos	33
<b>Figura 8.</b> Distribución de muestra en la lámina portaobjetos	37
<b>Figura 9.</b> Forma de distribución y extendido del control positivo	39
<b>Figura 10.</b> Forma de distribución y extendido del control negativo	39



**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA**

***DESARROLLO DE LÁMINAS PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE LA  
COLORACION DE GIEMSA Y ROMANOWSKY MODIFICADO  
UTILIZADAS EN EL DIAGNOSTICO DIRECTO DE *Trypanosoma cruzi*.***

**RESUMEN**

*Trypanosoma cruzi* es un protozoo sanguíneo, agente causal de la enfermedad de Chagas, En Colombia las enfermedades causadas por hemoparasitos se encuentran en lugares por debajo de los 1800 metros sobre el nivel del mar y la gota gruesa es uno de los métodos microscópicos directos ideales para el diagnóstico en fase aguda de la enfermedad. Los controles de calidad comerciales para coloraciones de Field y Giemsa, no se han desarrollado en Colombia.

El objetivo es desarrollar láminas para el control de calidad de la coloración de Field y Giemsa; con el fin de suministrar un control interno comercial a los laboratorios clínicos que realicen diagnóstico de enfermedad de Chagas, por medio de la técnica de gota gruesa, para asegurar resultados confiables en el diagnóstico.

Se recolectaron 18 muestras de sangre y se utilizaron 4 aislamientos de *Trypanosoma cruzi* entre el 2017 a 2019, se estandarizo y desarrollo el proceso de producción de las láminas de control de calidad a gran escala.

Se determinaron los procesos de producción de los controles de calidad internos para la coloración de Field y Giemsa, y su documentación respectiva para la distribución adecuada del producto.

Se desarrolló un control de calidad interno comercial para la coloración empleada en la técnica de gota gruesa, que incluye la visualización microscópica del parásito de *Trypanosoma cruzi*

**Palabras Claves Enfermedad** de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, gota gruesa, tinción, control de calidad, Field, Giemsa, Tripomastigote.

## INTRODUCCIÓN

*Trypanosoma cruzi* es un protozoo sanguíneo, agente causal de la enfermedad de Chagas. Puede afectar a cualquier persona que se encuentre en zona endémica, que tenga contacto con el vector, y con más frecuencia a personas que estén en un estado de inmunosupresión.<sup>1,2,3,4.</sup>

La enfermedad de Chagas es una de las enfermedades más desatendidas del mundo, y entre 25 – 90 millones de personas están en riesgo en contraer la enfermedad. Los vectores se encuentran ampliamente diseminados en la naturaleza especialmente en zonas por debajo de los 1800 metros sobre el nivel del mar, en países latinoamericanos.<sup>5,6</sup> La mayoría de los casos son causados por la picadura del vector triatomineo al huésped, aunque se han presentado casos de infección por transfusiones, trasplantes de órganos, trasmisión vertical y oral.<sup>7,8,9,10</sup>

Se presenta en dos fases, una fase aguda y una fase crónica, en fase aguda se puede diagnosticar la enfermedad por el hallazgo del tripomastigote en sangre periférica utilizando los métodos de gota gruesa y frotis de sangre periférica (FSP), en fase crónica no es posible hallar el tripomastigote por lo que el diagnóstico requiere de métodos serológicos, detectando inmunoglobulina G contra *Trypanosoma cruzi*.<sup>7,11</sup>

La importancia epidemiológica de esta enfermedad es relevante, al ser una de las enfermedades parasitarias más desatendidas, no se tiene un estimado de cuantas personas tienen la enfermedad en fase aguda, ya que en la mayoría de los casos no se presentan síntomas, y solo es diagnosticado cuando el paciente está en fase crónica donde ya se evidencia sintomatología cardíaca.<sup>12.</sup>

En Colombia, se calcula que entre 0,7 y 1,3 millones de personas están infectadas con *T. cruzi*, y de 3 a 4 millones se encuentran en riesgo de adquirir la infección. El parásito es prevalente a lo largo del valle del río Magdalena, el altiplano cundiboyacense, la región del Catatumbo, la Sierra Nevada de Santa Marta, el piedemonte llanero y la Serranía de La Macarena.<sup>8</sup>

La gota gruesa es el método microscópico directo ideal para la detección del parásito en fase aguda, por lo cual mediante este trabajo de investigación se busca desarrollar un control de calidad interno, que sea utilizado como una herramienta para asegurar el uso correcto del colorante y la técnica, en las tinciones de derivadas de Romanowsky y que además permita la visualización

microscópica de *T. cruzi*, como entrenamiento para la visualización del parasito en fase aguda de la enfermedad.

## OBJETIVOS

### GENERAL

Desarrollar láminas para el control de calidad de la coloración de Field y Giemsa con el fin de suministrar un control de calidad interno a los laboratorios clínicos, que realicen diagnósticos en enfermedades causadas por hemoparásitos, por medio de la técnica de gota gruesa, que contribuya al aseguramiento de los resultados confiables en el diagnóstico.

### ESPECIFICOS

- Desarrollar controles de calidad internos, para facilitar la evaluación de los colorantes con los que se realizan los diagnósticos directos en enfermedades causadas por hemoparásitos como la enfermedad de Chagas.
- Ofrecer comercialmente a las instituciones de educación superior de programas de medicina, bacteriología, biología y otros relacionados, las láminas de control de calidad interno con la presencia de *Trypanosoma cruzi* como material de docencia de fácil disponibilidad.
- Contribuir con la estandarización interna para el uso correcto de los colorantes, describiendo los errores técnicos más frecuentemente cometidos que afecten la calidad de las coloraciones y por ende el diagnóstico.
- Desarrollar un proyecto de innovación en la industria microbiológica colombiana, para la producción de controles de calidad internos de coloraciones para laboratorios clínicos del país.

## 1. ANTECEDENTES

*Trypanosoma cruzi* es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, la cual ha sido de importancia, debido a la gravedad de la enfermedad en fase crónica y el costo de su tamizaje y diagnóstico, tanto en hospitales como en bancos de sangre,<sup>4,13</sup> lo que origina costos elevados y una alta letalidad especialmente en poblaciones de escasos recursos. En la actualidad, aproximadamente 70 millones de personas viven en riesgo de contraer esta enfermedad (en comparación con 120 millones en 1990). Los costos anuales de atención al paciente se estiman en US \$ 627 millones y 806,170 DALY (disability-adjusted life years) anuales<sup>14</sup>

El diagnóstico de la Enfermedad de Chagas en fase aguda es de especial importancia para evitar los casos en fase crónica, por lo tanto este diagnóstico debe ser de forma oportuna y adecuada<sup>2</sup>.

La información con la que se cuenta acerca de la producción de láminas para control de coloración en gota gruesa y visualización de hemoparasitos es escasa, en la actualidad ninguna empresa colombiana las produce y los importadores no las comercializan fácilmente debido a que los volúmenes y consumos son muy bajos.

En los Estados Unidos la producción y distribución de los controles de calidad dirigidas a la visualización de hemoparasitos como *Plasmodium spp* y *Trypanosoma cruzi*, están a cargo de la empresa norteamericana Microbiologics® que a la fecha produce y distribuye controles en todo el país y otras partes del mundo mediante el frotis con el microorganismo no viable fijado con metanol u otros químicos para la seguridad biológica en los laboratorios clínicos (Microbiologics®)<sup>14</sup>, aunque según las guías técnicas de estas láminas, no se evalúa la coloración con la que se hace la técnica de gota gruesa y frotis de sangre periférica, por ende no se podría validar como control con ninguna de estas técnicas.

En la empresa norteamericana Hardy Diagnostics® también produce y distribuye controles de hemoparasitos, aunque la mayoría sigue los lineamientos y las técnicas utilizadas por Microbiologics®.

En Europa la empresa norteamericana Polysciense Inc. con sede en Alemania, produce este tipo de láminas de control de hemoparásitos, que consisten en un frotis de sangre fijado con metanol, y la presencia microscópica de *Babesia*,

*Plasmodium spp* y /o *Trypanosoma cruzi*, que se colorea mediante tinciones de Wright o Giemsa, valorando así solo la presencia del parasito mas no la calidad de la tinción<sup>16</sup>

Como conclusión, para definir un control de calidad interno adecuado para el país, se debe desarrollar un control con las características y especificaciones de una gota gruesa ideal, basándose en lineamientos del Instituto Nacional de Salud y la Secretaria Distrital de Salud, para así mejorar la técnica y el entrenamiento del personal encargado.

Con base en los antecedentes de producción de láminas para control de coloraciones de hemoparásitos en el mundo, se puede evidenciar que ninguna de estas ofrece la posibilidad de evaluar los colorantes de acuerdo a los lineamientos requeridos por los entes referentes en Colombia, y es aquí donde radica la importancia del presente proyecto, ya que se espera ofrecer un control de calidad interno con el que se permita la evaluación de colorantes y que además permita la visualización microscópica del parasito.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 *Trypanosoma cruzi*

#### 2.1.1. Generalidades

*Trypanosoma cruzi* es un protista de la clase *Kinetoplastea*, familia Trypanosomatidae, es el agente etiológico de la Enfermedad de Chagas, caracterizado por la presencia de un solo flagelo y una sola mitocondria, cuyo genoma se encuentra ordenado en una compleja región dentro de la propia mitocondria, y cerca de la base del flagelo denominada cinetoplasto.<sup>17,18,19,20</sup>

Este parasito presenta distintas morfologías dependiendo del tiempo de infección: amastigotes, epimastigotes y tripomastigotes. El amastigote es esférico u ovalado de 2-4  $\mu\text{m}$  de diámetro. Por lo general se encuentran en los tejidos del huésped, estos pueden ser visualizados por histología.

En los epimastigotes el cinetoplasto está localizado anterior al núcleo. Son alargados de aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  de longitud, tienen un flagelo libre, se encuentran en el tracto digestivo del vector triatomino.<sup>21,22</sup>

En los tripomastigotes, el cinetoplasto es posterior al núcleo. Se encuentra en la sangre del huésped y es la forma infectante presente en el vector triatomino, su longitud es de 20  $\mu\text{m}$ ., tiene un flagelo y una membrana ondulante a lo largo de su cuerpo. El tripomastigote del vector se le ha conocido como la forma metacíclica, infectante de los vertebrados, en esta forma no hay división celular.<sup>21,22</sup>

Es un parásito que exhibe una gran variabilidad genética representada en las seis unidades discretas de tipificación ( Discrete Typing Units, DTU ) establecidas (I a VI) y el nuevo genotipo Tcbat identificado en murciélagos en Brasil.<sup>23</sup>

Es un parásito intracelular con un ciclo de vida que involucra vertebrados e invertebrados. Es transmitido a los humanos por medio de vectores triatomíneos.<sup>5,7,17,24,25</sup> Las especies, *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata*, *Rhodnius prolixus* y *Rhodnius pallescens* son los cuatro insectos vectores más importantes en la transmisión de *Trypanosoma cruzi* al hombre.

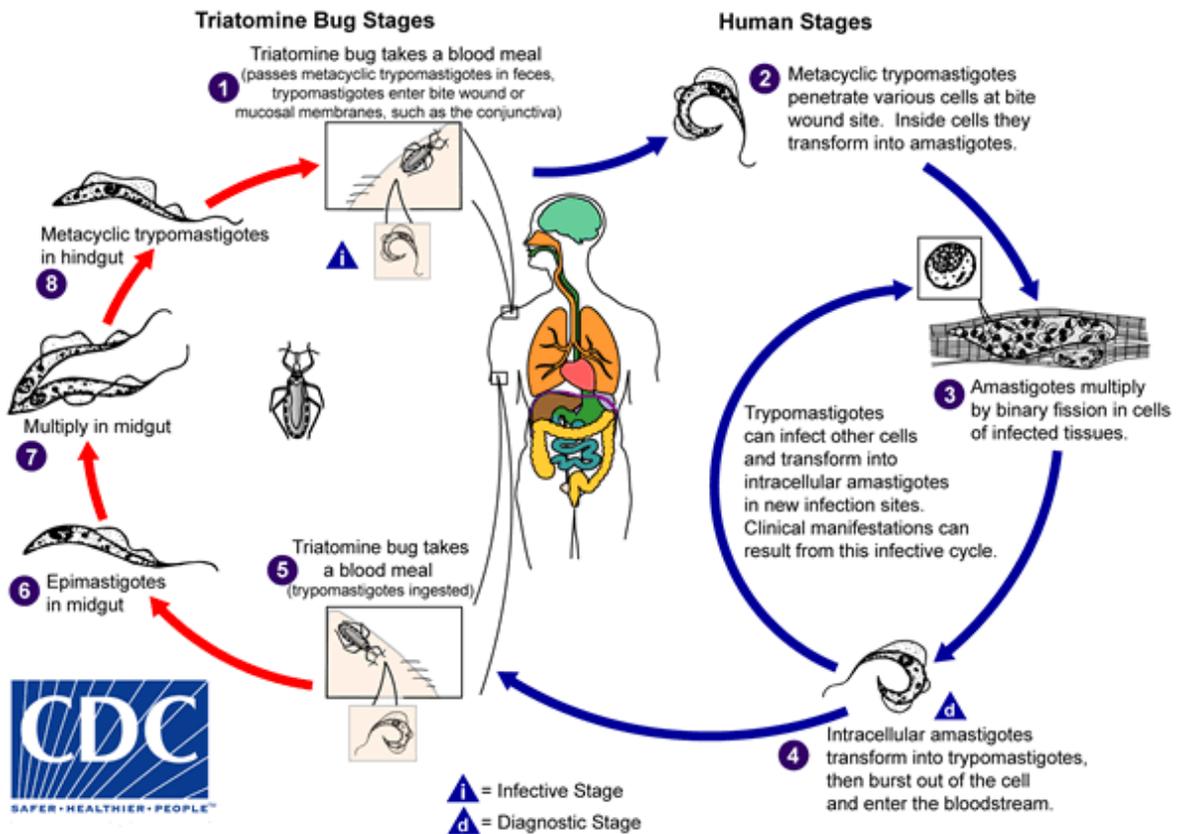
#### 2.1.1.1 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

En la figura 1. Se puede visualizar el ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*, el cual consiste en dos etapas:

- **Etapas en el ser humano:** El ciclo se inicia cuando un insecto triatomino infectado con el parásito pica a un ser humano y defeca. Los tripomastigotes metacíclicos se encuentran en las heces **(1)**. Entran en el ser humano a través de las heridas producidas al rascarse por la picadura del vector. Cuando entran en una célula humana, se convierten en amastigotes **(2)**. Esta es una etapa reproductiva a través de mitosis. Después de la reproducción, una gran cantidad de amastigotes se encuentran en la célula infectada, formándose pseudoquistes **(3)**. Los amastigotes se convierten de nuevo en tripomastigotes y las células se rompen. Los tripomastigotes vuelven a infectar otras células repitiéndose el ciclo de multiplicación **(4)**.<sup>7,11</sup>

**Etapas en el insecto:** Cuando el insecto triatomino pica a un ser humano infectado, algunos Tripomastigotes pasan a él a través de la sangre **(5)**. En el intestino del insecto, se transforman en epimastigotes **(6)**, los cuales constituyen una segunda etapa reproductiva **(7)**. Después de la reproducción a través de mitosis, los epimastigotes pasan al recto. Allí se convierten en Tripomastigotes metacíclicos **(8)** y se evacúan a través de las heces. Las heces pueden infectar a un nuevo hospedador **(1)**, repitiéndose el ciclo.<sup>7,11</sup>

**Figura 1. Ciclo de vida *Trypanosoma cruzi* – Tomado de : Center for Diseases Control and Prevention<sup>11</sup>**



### 2.1.1.2 Transmisión de *Trypanosoma cruzi*.

La transmisión de *Trypanosoma cruzi* se puede presentar en diferentes formas:

#### Transmisión vectorial

La transmisión vectorial inicia cuando el insecto triatomino pica a una persona para alimentarse con su sangre, defeca muy cerca de la picadura. En las heces que deposita sobre la piel se encuentra el parásito en forma de Tripomastigote metacíclicos, que pasa a la sangre cuando la persona se rasca. En ocasiones las heces pueden pasar a través de las mucosas, si se han depositado cerca de las mismas (por ejemplo, a través de la mucosa ocular).<sup>7,11,10,26</sup>

La infección ocurre por una especie de heteróptero (Triatomino) de género *Rhodnius*, *Triatoma* y *Panstrongylus*, son abundantes y se han encontrado en una amplia variedad de zonas ecológicas, tienen hábitos primordialmente domiciliarios y buena capacidad para infectarse y transmitir.<sup>1,7</sup>

## **Transmisión vertical**

La transmisión vertical (Transmisión de Madre a Hijo) es una de las más frecuentes ya que no presenta síntomas la gestante, cuando se encuentra en fase aguda. Una mujer embarazada que tiene la enfermedad puede transmitirlo a su bebé. Este tipo de transmisión se puede producir también fuera de zonas endémicas de la enfermedad. Es importante que los hijos de cualquier mujer portadora de Chagas se realicen la prueba, aunque hayan nacido fuera de América Latina. A pesar de ello, esta enfermedad no es un obstáculo para que tanto el embarazo como la lactancia se puedan desarrollar con normalidad.<sup>7,17</sup>

También están la transmisión accidental por punción u otro tipo de contacto con material contaminado con el *T. cruzi*, así como la transmisión mediante la leche materna.

## **Transmisión por trasplantes o transfusiones**

La transmisión por una transfusión de sangre (o derivados) o un trasplante de órganos de un donante a que tenga la infección por *T.cruzi*, el receptor podría contraer por medio de este la enfermedad de Chagas.<sup>4,27</sup>

Hoy en día existen mecanismos de control en los bancos de sangre y en los procesos de donación de órganos para evitar estas formas de transmisión.<sup>4,7</sup>

En los trasplantes de órganos, los estudios han demostrado la transmisión del parásito en corazón, riñón.<sup>28</sup>

## **Transmisión Oral**

La transmisión oral se da por el consumo de alimentos o bebidas que han sido contaminados con heces de triatominos infectados o la ingestión accidental del insecto, también se puede adquirir por contaminación con utensilios usados para la preparación de alimentos. Se debe sospechar la forma de transmisión oral cuando se identifiquen los siguientes hallazgos: Presencia simultánea de dos o más casos agudos confirmados, con nexo epidemiológico entre ellos<sup>5,8,26,29</sup>

## **Transmisión por accidente de laboratorio**

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

## 2.1.2 Epidemiología

Según las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en los años 90 se calculaba que había 100 millones de personas en riesgo, 16 a 18 millones infectadas, y unas 45.000 muertes atribuibles a esta enfermedad.<sup>6,7,30</sup> En este contexto, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) promovió diferentes iniciativas para poner en marcha y desarrollar medidas de control de la transmisión vectorial, transfusional y materno-fetal de la enfermedad de Chagas, acordes a las características epidemiológicas de cada región. Como consecuencia de estas actividades, en los últimos años se ha observado una importante reducción en la incidencia de la enfermedad. Sin embargo, según estimaciones de la OMS en el año 2009, seguían infectadas 10 millones de personas, y se produjeron 10.000 muertes<sup>30</sup>

### 2.1.2.1 Epidemiología en América

Se calcula que la mayoría de las personas infectadas por el parásito *Trypanosoma cruzi*, se encuentra en América Latina. Es endémica en 21 países de la Región.<sup>7,14,20,31,32</sup> (Figura 2.)

La infección se localiza únicamente en América, desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina y Chile<sup>6,7,32</sup> Con una incidencia anual de 30.000 casos vectoriales en la región de las Américas y 9.000 recién nacidos infectados durante el embarazo, la enfermedad de Chagas afecta a unos 6 millones de personas y provoca, en promedio, alrededor de 14.000 muertes al año.<sup>5,30</sup>

La enfermedad de Chagas puede causar consecuencias irreversibles y crónicas en el sistema nervioso, el sistema digestivo y el corazón. Se calcula que alrededor de 70 millones de personas en las Américas viven en áreas de exposición y están en riesgo de contraer esta enfermedad<sup>30</sup>

Mientras no mejoren los determinantes de la salud que inciden directamente en la transmisión del Chagas, o la infraestructura de las viviendas favorezcan la presencia del vector, la enfermedad será difícil de controlar<sup>5,32</sup>

**Figura 2. Enfermedad de Chagas en América, Tomado de: Organización Panamericana de la Salud<sup>2</sup>**



### 2.1.2.2 Epidemiología en Colombia

En la semana epidemiológica número 33 de 2019, se han registrado 38 casos de Enfermedad de Chagas en fase agudo, reportados al Sistema Nacional de Vigilancia SIVIGILA en el departamento del Atlántico, Casanare y Tolima, un aumento del 78 % con respecto al año 2018. <sup>33</sup>

En el boletín epidemiológico de la Semana 13 de 2019 muestra también que en 2018 no hubo casos de muerte por Chagas agudo en Colombia, sin embargo, los brotes de transmisión oral ocurridos en 2019 han aumentado la tasa de letalidad a

7,9 %; una tasa que está por encima de otras enfermedades transmitidas por vectores como dengue y malaria

Para los casos en fase aguda uno de los indicadores más relevantes es la tasa de letalidad, que en promedio desde 2012 hasta 2017, fue de 13,7 casos por 100 casos confirmados. Gracias a los esfuerzos sumados entre instituciones nacionales, entidades territoriales y entidades hospitalarias, la tasa de letalidad para el año 2018 fue de 0 muertes; la más baja en los últimos 8 años (Figura 3) <sup>34</sup>

**Figura 3. Mortalidad en casos confirmados de Enfermedad de Chagas, Boletín Epidemiológico Semana 13 de 2019, Tomado de: Instituto Nacional de Salud** <sup>34,35</sup>



Con relación a los casos en fase crónica, específicamente en la población priorizada que son los menores de 18 años, las gestantes y los indígenas de la sierra nevada de Santa Marta (Coguis, Arawacos y Wiwas), hubo un aumento significativo en la confirmación de casos. De esta manera se pasó del porcentaje de confirmación más bajo presentado en 2017 el cual fue de 23,6 % al más alto en los últimos siete años, 88,2 % en el periodo epidemiológico III de 2019 (Figura 4).

**Figura 4. Epidemiología de Enfermedad de Chagas, Porcentajes de confirmación de casos en fase crónica, Boletín Epidemiológico Semana 13 de 2019, Tomado de: Instituto Nacional de Salud** <sup>34,35</sup>



### 2.1.3 Diagnóstico

**Figura 5. Métodos de diagnóstico de la enfermedad de Chagas, Tomado de: Center for Neglected Tropical Diseases<sup>25</sup>**

En la figura 4 se puede evidenciar los diversos métodos de diagnóstico, dependiendo de la fase en la que curse la enfermedad.

**TABLA 1**

Métodos de diagnóstico de la enfermedad de Chagas		
	Fase aguda (parasitológicos y moleculares)	Fase crónica (serológicos)
Áreas rurales y/o de recursos reducidos	Xenodiagnosia Microscopía Microhematocrito	Test rápido
Áreas urbanas y/o de recursos elevados	PCR	HAI ELISA IFI

Existen diversos métodos para detectar los parásitos en la sangre del paciente. Algunos de estos se utilizan mayoritariamente para propósitos de investigación, mientras que otros se emplean en los laboratorios de diagnóstico habitual<sup>2,7,25,36</sup>

Actualmente, para el diagnóstico de los pacientes crónicos, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda la realización de dos pruebas basadas en diferentes principios y antígenos, y una tercera en caso de discordancia.<sup>2,25</sup>

En general, los métodos se clasifican en directos o indirectos.

Los métodos directos detectan el parásito en la sangre del paciente, por medio de tinciones, especialmente por las Coloraciones derivadas de Romanowsky (Field, Giemsa, Wright y Romanowsky Modificado), suelen denominarse métodos parasitológicos, y la mayoría están basados en la microscopía.

El diagnóstico mediante microscopía se basa en la visualización del parásito en la sangre de los pacientes utilizando la técnica de gota gruesa y/o frotis de sangre periférica según la normativa vigente. Existen diferentes variantes, que incluyen métodos de concentración (Strout) y micro hematocrito para el diagnóstico en recién nacidos con la recolección de sangre en capilares.<sup>37,38</sup>

Así mismo, existen otras técnicas dentro de esta categoría, como el cultivo y el xenodiagnóstico, este último basado en la aplicación de los insectos vivos directamente en la piel de los pacientes, cuya utilización está muy limitada por el alto riesgo de infección del personal sanitario, la incomodidad de los pacientes o su poca practicidad.<sup>7,13,25</sup>

Los métodos indirectos detectan el ADN del parásito (métodos moleculares, especialmente la reacción en cadena de la polimerasa [PCR]) o los anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* en la sangre del paciente (métodos serológicos).

Esta estrategia presenta muchas variantes, cada una de ellas con diferentes grados de sensibilidad y especificidad.

Las técnicas serológicas incluyen diversos métodos, entre los cuales se incluyen ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), IFI (imnfluorescencia indirecta) y HAI (hemaglutinación indirecta). Todos ellos se basan en la detección de las inmunoglobulinas G (IgG) anti-*T. cruzi* en la sangre de los pacientes y su reacción colorimétrica visible en el caso de que la sangre de los pacientes contenga los anticuerpos. (26)

#### **2.1.4 Tratamiento**

Para el tratamiento de la enfermedad de Chagas se utilizan medicamentos con acción tripanocida tales como el nifurtimox y el benznidazol.<sup>7,18</sup>

En la fase aguda el tratamiento constituye una urgencia médica, este proceso busca evitar la progresión hacia la fase crónica, pero tiene como un primer objetivo evitar complicaciones inmediatas que pueden surgir por el compromiso de órganos blanco durante esta fase de la enfermedad.<sup>18</sup>

En la fase crónica el tratamiento ideal impediría la progresión de la enfermedad con daño cardíaco o digestivo y la eliminación del parásito (Esofagopatía Chagásica y Megacolon)<sup>7</sup>, que puede ocurrir a mediano y largo plazo por la infección crónica.<sup>18</sup>

Ambos medicamentos son eficaces casi al 100% para curar la enfermedad si se administran al comienzo de la infección en la etapa aguda, incluso en los casos de transmisión congénita. Sin embargo, su eficacia disminuye a medida que transcurre más tiempo desde el inicio de la infección. El tratamiento con estos medicamentos también está indicado en caso de reactivación de la infección (por ejemplo, por inmunodepresión) y en los pacientes al principio de la fase crónica.<sup>39</sup>

Se debe ofrecer tratamiento a los adultos infectados, especialmente a los que no presentan síntomas, dado que el tratamiento antiparasitario puede evitar o frenar la progresión de la enfermedad y prevenir la transmisión congénita en las embarazadas.<sup>7,18,40</sup>

El benznidazol y el nifurtimox no deben administrarse a las embarazadas ni a las personas con insuficiencia renal o hepática. El nifurtimox también está contraindicado en personas con antecedentes de enfermedades del sistema nervioso neurológicas o trastornos psiquiátricos.

Es necesario revisar la historia clínica del paciente, para tratar sintomatología cardíaca o digestiva.<sup>7,18</sup>

## **2.1.5. Técnicas**

### **2.1.5.1 Gota gruesa**

La gota gruesa es un método microscópico directo el cual consiste en el extendido de diversas capas de sangre capilar o sangre anticoagulada para la visualización de parásitos.<sup>1,41</sup>

#### Procedimiento

- Se desinfecta el lugar de punción
- La punción se hace de manera firme y segura.
- Se hace presión y se limpia la primera gota de sangre. Se empieza a trabajar a partir de la segunda gota de sangre presionando hasta obtener una gota grande y globosa. Se coloca la lámina por encima de la gota de sangre evitando tocar la incisión hecha con la lanceta.
- Ayudado con otra lámina portaobjeto se extiende de manera adecuada la muestra de sangre logrando un área aproximada de 1 cm x 1cm o de 1 cm x 1,5 cm. La muestra debe quedar homogénea.
- Una vez elaboradas las gotas gruesas se dejan secar a temperatura ambiente por 20 minutos, en un mesón horizontal y ordenado. Se debe proteger de los insectos cuando sea necesario.
- Con las muestras elaboradas a partir de sangre anticoagulada es necesario tener un especial cuidado en el secado, debido a que tienden a irse o lavarse durante el procedimiento de coloración. Por lo tanto, se recomienda que después de secar la muestra a temperatura ambiente, la lámina sea sometida a calor suave (37 °C) por un tiempo de 1 minuto y posteriormente dejarla enfriar muy bien para posteriormente proceder a colorearla. No exceder el tiempo que se somete la muestra a calor debido a que la sangre se fija a la lámina y posteriormente no es posible deshemoglobinizar la gota gruesa.
- Para finalizar la toma de muestra del paciente se limpia con algodón embebido en alcohol en el sitio de punción para finalmente colocar una torunda de algodón seca en esta zona.

### **2.1.5.2 Frotis de sangre periférica**

A partir de la punción capilar como se indicó para la gota gruesa o a partir de sangre anticoagulada se toma una gota pequeña para elaborar el extendido.<sup>1,41</sup>

- La gota de sangre que se utiliza para realizar el extendido es mucho más pequeña que la utilizada para la gota gruesa (1  $\mu$ L aproximadamente) y se coloca hacia un lado de la lámina y con la ayuda de otro portaobjeto de borde biselado se procede a extender la muestra.
- La lámina en la que coloca la gota de sangre debe ser tomada de los extremos evitando colocar los dedos en los bordes que dan el largo de la lámina para que la lámina extensora tenga un libre deslizamiento.
- Se debe considerar que la gota de sangre tiene una parte anterior y otra posterior con respecto a la posición de la identificación de la lámina, entonces se coloca la lámina extensora en la parte anterior de la gota con una inclinación aproximada de 45° y por capilaridad se deja extender la gota de sangre en el borde de la lámina extensora y antes de que la sangre llegue a los bordes de la lámina se desliza la extensora hacia adelante.
- Para finalizar la toma de muestra del paciente se limpia con algodón embebido en alcohol en el sitio de punción para finalmente colocar una torunda de algodón seca en esta zona. Pídale al paciente que sostenga el algodón en esta posición haciendo ligera presión.

## **2.1.6 Coloraciones**

### **2.1.6.1 Coloración de Field**

El procedimiento para la coloración de Field, esta descrita en los manuales de procedimientos de Malaria y Enfermedad de Chagas del Instituto Nacional de Salud y se considera como la coloración principal<sup>7,41,42</sup>

En la pre-coloración el Field azul de metileno fosfatado, inicia el proceso de deshemoglobinización, además de preservar las células sanguíneas. En el proceso de coloración, los componentes básicos o tiacinas como el azul de metileno y sus análogos producidos por desmetilación oxidativa: azur B, azur A y azur C del Field Solución A; y los ácidos o eosinatos de tiacinas del Field Solución B, diferencian las estructuras parasitarias y completan la deshemoglobinización, dando un color rojo a la cromatina del parásito, azul para el citoplasma, y de amarillo a carmelito oscuro para el pigmento malárico. Las sales fosfatadas pH 7.2, proporcionan un medio que preserva las células y permiten la obtención de colores ideales.<sup>1,41,42</sup>

## **Procedimiento.**

### **Método Romanowsky (modificado)**

- Mezclar en un tubo una gota de solución a, una gota de solución b y 3 ml de sales fosfatadas por cada lámina que se va a colorear.
- Sumergir la lámina en azul de metileno fosfatado durante 1 segundo.
- Sacar y sumergir en Field sales fosfatadas por 1 segundo, eliminar el exceso de colorante, colocando el extremo libre de la lámina sobre una compresa.
- Colocar la lámina en forma invertida sobre una lámina curva y dejar deslizar la mezcla preparada por debajo de la lámina, hasta llenar la depresión, evitando la formación de burbujas en la gota gruesa o cerca de ella. Este paso favorece la deshemoglobinización
- Dejar actuar el colorante durante 9 a 15 minutos.
- Enjuagar la lámina con sales fosfatadas
- Escurrir y dejar secar.

Cabe resaltar que para el manual de procedimientos de Malaria y Enfermedad de Chagas emitido por el Instituto Nacional de Salud, recomienda la estandarización de los tiempos de coloración dependiendo del lote a utilizar<sup>1,41</sup>.

#### **2.1.6.2 Coloración de Giemsa**

El procedimiento para la coloración de Giemsa, esta descrita en los manuales de procedimientos de Malaria y Enfermedad de Chagas del Instituto Nacional de Salud<sup>1,43</sup>

En la pre-coloración la solución azul de metileno fosfatado Albor, inicia el proceso de deshemoglobinización permitiendo la visualización de los parásitos que quedan fijados a la placa. En la coloración, los compuestos de azur (tionina y sus derivados metilados) con eosina y azul de metileno, diferencian las estructuras parasitarias, dando un color rojo a la cromatina del parásito y azul para el citoplasma. Las sales fosfatadas pH 7.2, proporcionan un medio que preserva las células y permiten la obtención de colores ideales.<sup>43</sup>

#### **Procedimiento para gota gruesa**

- Mezclar en un tubo limpio dos gotas de colorante Giemsa por cada mililitro de sales fosfatadas
- Sumergir en azul de metileno fosfatado la lámina con la gota gruesa por un segundo.
- Retirar el exceso de colorante con una compresa.
- Colocar la lámina en forma invertida sobre una lámina curva y dejar deslizar la mezcla preparada por debajo de la lámina, hasta llenar la depresión, evitando la formación de burbujas. Este paso favorece la deshemoglobinización,
- Dejar actuar el colorante a temperatura ambiente durante 6 a 10 minutos.
- Retirar y lavar cuidadosamente con un chorro suave de agua, por el reverso de la lámina.
- Secar al aire.

Cabe resaltar que los manuales de procedimientos del Instituto Nacional de Salud recomiendan hacer la estandarización del procedimiento relacionada a los tiempos en cada laboratorio

### 3. DISEÑO METODOLÓGICO

#### 3.1 UNIVERSO, POBLACION Y MUESTRA

**Universo:** Personas voluntarias con consentimiento informado, sanos sin ningún tipo de patología

**Población:** Muestras de Sangre provenientes de personas sanas de la ciudad de Bogotá D.C

**Muestra:** Muestras de sangre de personas sanas a infectar con aislamientos de *Trypanosoma cruzi*.

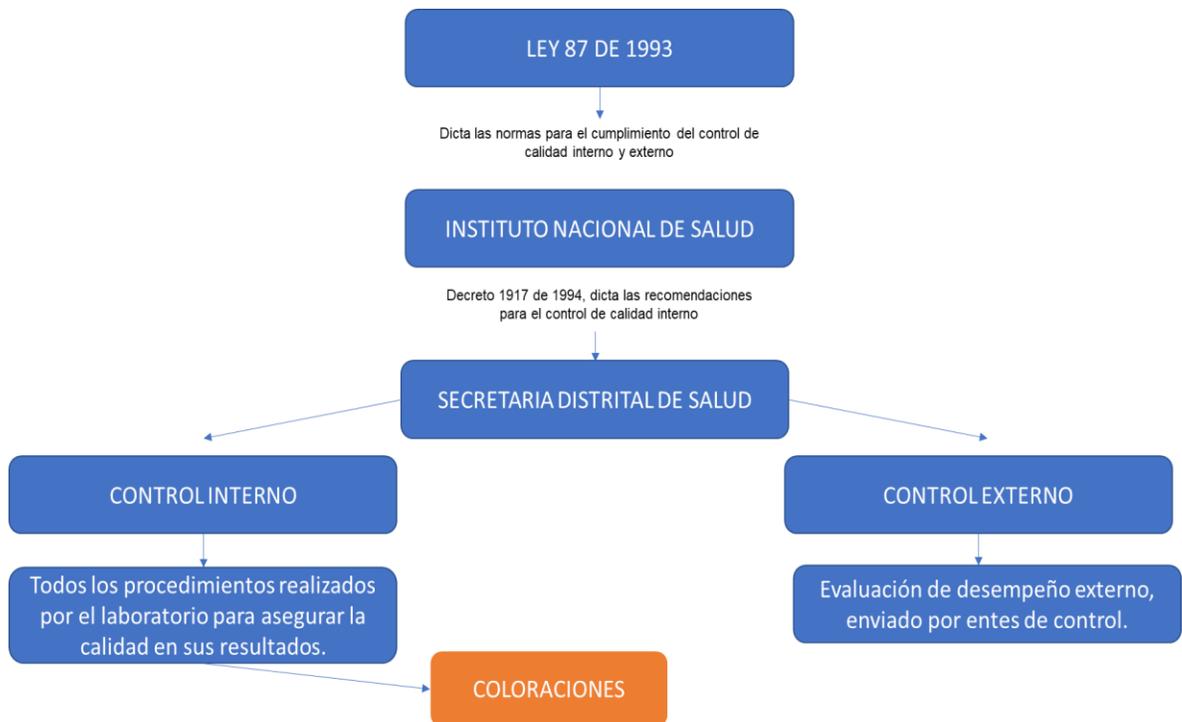
#### 3.2 RECOLECCION DE INFORMACION CORRESPONDIENTE A LA NORMATIVIDAD VIGENTE

Bajo el marco de normatividad vigente para controles de calidad se refiere directamente al decreto 1917 de 1994 donde se dictan las disposiciones generales de un laboratorio clínico, y establece que el control de calidad interno “*son los procedimientos basados en las normas recomendadas por el Instituto Nacional de Salud, garantía de calidad establecidos por el mismo laboratorio con el fin de garantizar que los resultados obtenidos reflejen la condición real del paciente*” “*Presidencia de la Republica de Colombia*”<sup>45</sup>

Teniendo en cuenta esto la estandarización de las coloraciones es parte del control de calidad interno que se debe realizar para garantizar coloraciones óptimas y se realiza cuando se cambia de lote en uno de los componentes de la coloración.<sup>45</sup>

En la figura 6, se puede observar como la secretaria distrital de salud y el instituto nacional de salud, hacen el control tanto interno como externo para las técnicas en laboratorio y como se definen dependiendo de cada uno.

**Figura 6. Control de calidad en coloración para Gota gruesa y Frotis de sangre periférica, Instituto Nacional de Salud – Secretaria Distrital de Salud**



### 3.3 OBTENCION DE AISLAMIENTOS DE PARASITOS

Por medio de una alianza estratégica entre la Industria Nacional de Microbiología y la Universidad Antonio Nariño se obtuvieron aislamientos de *Trypanosoma cruzi*. Al ser un parásito de un tamaño relativamente grande, fue el elegido para determinar la afinidad de los colorantes al parásito.

### 3.4 AISLAMIENTOS DE *Trypanosoma cruzi*

El parásito suministrado aislado se obtuvo de un paciente del municipio de la Mesa (Cundinamarca) obtenido por el grupo de genética de la Universidad Antonio Nariño, se cultivaron en medio LIT (Liver Infusion Tryp- tose) y para las réplicas se utilizaron Medio Tobi y DMEN (Dulbecco' Modified Eagle's Medium) con cultivo celular con una tasa de crecimiento 7 – 8 Días,

Los parásitos se inactivan y se lavan con glutaraldehído, los parásitos resultantes se diluyen en PBS 10x y se preparan viales de 500 µl, estos se envían a la Industria Nacional de Microbiología a una temperatura de 9°C.

### 3.5 CONCENTRACIONES DE *Trypanosoma cruzi*

Se probaron varias concentraciones del parásito, estas fueron aumentando gradualmente, mientras se determinaba la concentración ideal para el proceso de producción como se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1. Concentraciones del parásito evaluadas**

Concentración de <i>Trypanosoma cruzi</i> (parásitos por ml)	Volumen del vial concentrado (µl)	Volumen final (ml)
$4,5 \times 10^4$	500	4.5
$5 \times 10^4$	500	4.5
$5 \times 10^5$	500	4.5
$1 \times 10^6$	500	4.5

### 3.6 MUESTRAS CLINICAS UTILIZADAS

Las muestras que se utilizaron en el desarrollo del trabajo fueron sangre venosa anticoagulada con EDTA y Citrato de sodio, se obtuvieron 4 ml de muestra de personas voluntarias. Las muestras fueron recolectadas entre el 2018 y 2019, todas las personas firmaron consentimiento informado para conocimiento de estudio. Se recolectaron en total 18 tubos de sangre.

Los conteos leucocitarios y plaquetarios en todas las muestras fueron normales.

### 3.7 ESTANDARIZACION DEL PROCESO DE PRODUCCION

#### 3.7.1 Estandarización de distribución de muestra en la lámina portaobjetos

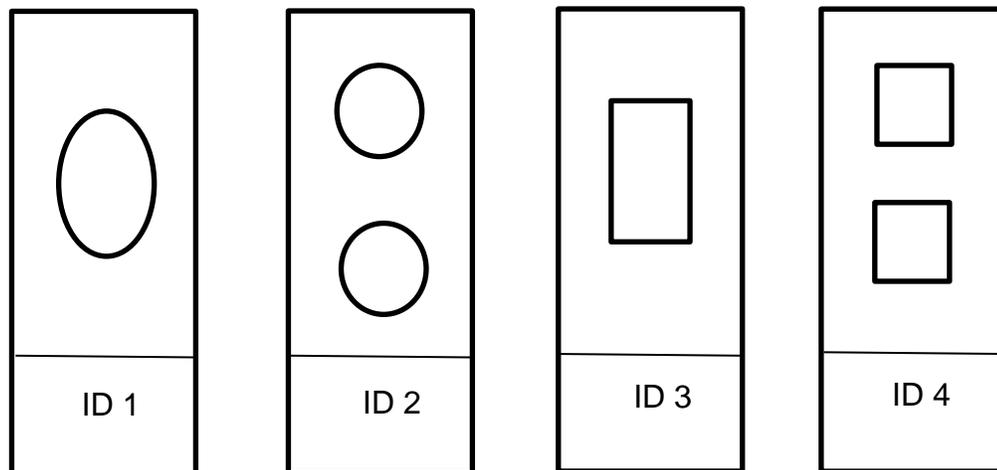
Teniendo en cuenta la normatividad vigente, se desarrolló el control de calidad específico para Colombia ya que la técnica de Gota gruesa es el método microscópico ideal para el hallazgo de parásitos en sangre en fase aguda de la enfermedad.

Se inicio con la estandarización de la distribución de la muestra en las láminas portaobjetos. Las láminas utilizadas en este trabajo fueron marca Microscope

Slides Medic life® CAT N° 7105, caja por 50 unidades. Se lavaron con agua y se desengrasaron con alcohol antiséptico al 70%.

Según el Instituto Nacional de Salud la distribución de la lámina son dos cuadros de 1cm x 1cm o de 1.5 cm x 1.5 cm separados por 0.5 cm entre ellos. Pero al ser un control de coloración se contempló la posibilidad de otras formas en la lámina como se muestra en la figura 7.

**Figura 7. Posibles formas de distribución de muestra en la lámina portaobjetos**



\*ID: identificación de lámina o rotulo

Tras el montaje de las diferentes formas, se pudo determinar que la distribución adecuada es ID 4, ya que la cantidad de muestra es menor y corresponde a una gota gruesa tradicional que es la recomendada por el Instituto Nacional de Salud.

### **3.7.2 Determinación de volumen de muestra por cada lamina portaobjetos**

Se recolectaron 4 mililitros de muestra de sangre venosa y se le adiciono 0.5 mililitros de PBS 10 x, esto con el fin de simular la mezcla con el vial de parásitos concentrados.

Por medio de pruebas se realizaron 20 gotas gruesas con diferentes volúmenes de muestra, estas se secaron a temperatura ambiente por 30 minutos y se colorearon por el método de Romanowsky modificado (Field).

### **3.7.3 Determinación de tiempos de coloración para pruebas de estabilidad**

Se utilizaron colorantes Albor para la estandarización de los tiempos de coloración, como lo sugiere la Guía para la vigilancia por laboratorio de *Trypanosoma cruzi* y el Manual para el diagnóstico de malaria no complicada del Instituto Nacional de Salud<sup>1,41</sup>

### **3.8 PRUEBAS DE ESTABILIDAD DEL PRODUCTO**

Las pruebas de estabilidad del producto se realizaron por medio del montaje de un lote piloto de 100 láminas, las cuales fueron coloreadas en distintos periodos de tiempo, se hizo una valoración macroscópica y una microscópica.

Esto con el fin de evidenciar el tiempo de vida útil de las láminas e informarlo en el inserto adjunto al producto.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 VOLUMEN IDEAL DE LA MUESTRA EN LA LAMINA PORTAOBJETOS

La elección del volumen ideal de la muestra se relacionó con la escala sugerida por Field en 1993 y que esta descrita en la Guía técnica de laboratorio para Malaria de la Secretaria Distrital de Salud.<sup>45</sup>

Lamina	Volumen (µl)	Deshemoglobinización	Plaquetas	Grado de Coloración
V1	2	Caída de la muestra	-----	-----
V2	2.5	Caída de la muestra	-----	-----
V3	3	Caída de la muestra	-----	-----
V4	3.5	Caída de la muestra	-----	-----
V5	4	Caída de la muestra	-----	-----
V6	4.5	Completa	No visibles	Grado lo II
V7	5	Completa	No visibles	Grado lo II
V8	5.5	Completa	Rosa intenso	Grado III
V9	6	Completa	Rosa intenso	Grado III
V10	6.5	Completa	Violeta	Grado VI
V11	7	Completa	Violeta	Grado V
V12	7.5	Completa	Violeta intenso	Grado V
V13	8	Completa	Violeta intenso	Grado V
V14	8.5	Completa	Violeta intenso	Grado V
V15	9	Incompleta	Rosa intenso	Grado II
V16	9.5	Incompleta	No visibles	Grado I
V17	10	Incompleta	No visibles	Grado I
V18	10.5	Incompleta	No visibles	Grado I
V19	11	Incompleta	No visibles	Grado I
V20	11.5	Incompleta	No visibles	Grado I

**Tabla 2. Resultados de volúmenes de muestra en la lámina portaobjetos**

Tras los resultados obtenidos en la tabla 2, se decidió que la cantidad de muestra en las láminas podría estar entre un rango de 7 a 8.5 microlitros por cada cuadro, ya que estas cantidades mostraron mejores resultados en la coloración.

## 4.2 ELECCION DE LA CONCENTRACION DEL PARASITO

La determinación de la concentración ideal se realizó por medio del promedio de parásitos por campo en 200 campos microscópicos, la coloración utilizada fue Romanowsky modificado (Field). (Tabla 3)

**Tabla 3. Estandarización de concentración ideal con respecto al volumen de muestra y el número de parásitos por campo microscópico.**

Concentración de <i>Trypanosoma cruzi</i>	Volumen de muestra de sangre anticoagulada	Volumen final	Numero de parásitos por campo
$4,5 \times 10^6$ parásitos por mililitro	4 mililitros	4.5 mililitros	9 a 13
$5 \times 10^4$ parásitos por mililitro	1.5 mililitros	2 mililitros	0 a 4
$5 \times 10^5$ parásitos por mililitro	1.5 mililitros	2 mililitros	4 a 7
$1 \times 10^6$ parásitos por mililitro	1.5 mililitros	2 mililitros	7 a 10

Para evaluar la afinidad de los colorantes y determinar la presencia del parásito en la lámina se tomó la decisión utilizar la concentración  $5 \times 10^4$  parásitos por mililitro.

## 4.3 INFORMACION DEL CONTROL DE CALIDAD

Las láminas para el control de calidad de coloraciones empleadas en la técnica de gota gruesa son un método cualitativo que se utiliza con el fin de asegurar al laboratorio clínico, el correcto funcionamiento de los colorantes y de la técnica utilizada, el objetivo es evidenciar la presencia del parásito de *Trypanosoma cruzi* en estadio de tripomastigote y de esta forma realizar un diagnóstico confiable.

Estas laminas también sirven como material educativo para diferenciar la morfología del parásito *Trypanosoma cruzi* en diferentes coloraciones. Anexo 1.

Las láminas son un portaobjetos con dos cuadrados, simulando una gota gruesa, con las indicaciones del Instituto Nacional de Salud. Uno de ellos contiene el control positivo, éste es realizado con la presencia del parásito de *Trypanosoma cruzi*, el control está hecho de tal forma que tiene las mismas características de una muestra de sangre capilar y venosa es decir leucocitos, plaquetas y una completa deshemoglobinización y el parásito en estadio de Tripomastigote

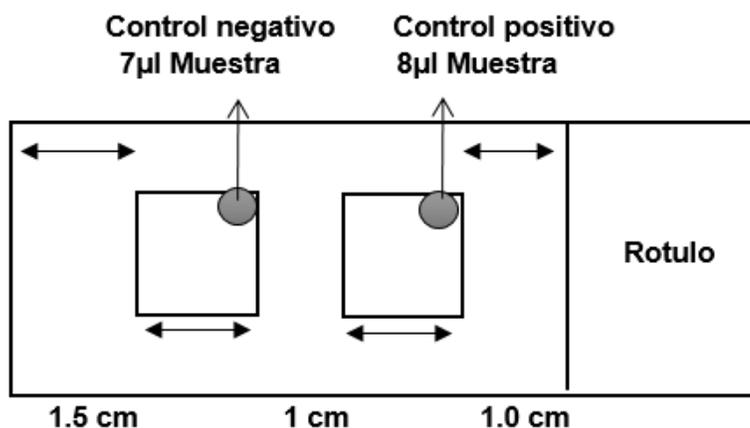
característico de la enfermedad de Chagas en fase aguda. El otro cuadrado contiene el control negativo que es realizado con las mismas características de una muestra de sangre capilar y venosa es decir leucocitos, plaquetas y una completa deshemoglobinización.

#### **4.4 PROCESO DE PRODUCCION DEL PRODUCTO**

Teniendo en cuenta los resultados anteriores se procedió a la estandarización del proceso de producción de las láminas de control de calidad para coloraciones derivadas de Romanowsky utilizadas en la técnica de gota gruesa, y se desarrolló la documentación correspondiente. Anexo 2.

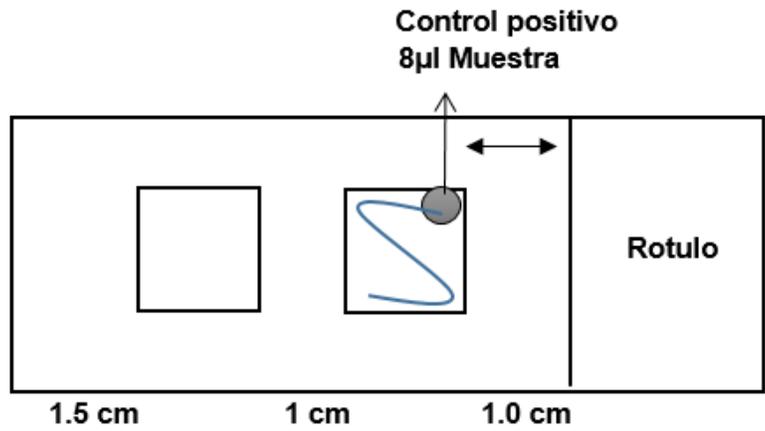
1. Se prepara la zona de extracción de sangre, se verifica que esté limpia y desinfectada
2. Se extraen 2 tubos de 4 mililitros de sangre venosa fresca en tubo tapa lila (anticoagulante EDTA) o tubo tapa azul (anticoagulante Citrato de Sodio), usando el método Vacutainer.
3. Inmediatamente se limpia y desinfecta la zona de preparación y montaje del lote correspondiente de laminas
4. Se retira de la nevera un vial de parásitos concentrados y se dejan a temperatura ambiente por 15 minutos, se registra la fecha de preparación del vial.
5. Previamente con un lápiz grabador de vidrio se dibujan los cuadros en las láminas portaobjetos. Figura 8.
6. Se prender el mechero y se preparan las láminas con cuadrados anteriormente descritos  
Las láminas se desengrasan un día antes con alcohol y se secan totalmente

**Figura 8. Distribución de muestra en la lámina portaobjetos**



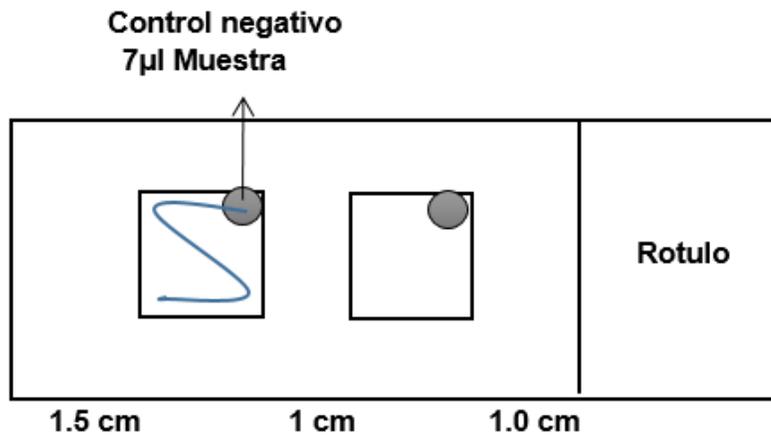
7. A continuación, se mezcla suavemente un tubo con muestra sangre anticoagulada (EDTA o Citrato de sodio)
8. En un tubo tapa rosca estéril, se agregan con una jeringa, 1.5 ml de sangre anticoagulada (EDTA o Citrato de sodio)
9. Se marca el tubo con el nombre del anticoagulante utilizado, el nombre del parásito, concentración del parásito y fecha de producción.
10. Se mezcla suavemente el vial de parásitos concentrados
11. Se adiciona con una pipeta automática y una punta estéril, el vial de parásitos concentrados al tubo tapa rosca que contiene la sangre previamente añadida
12. El contenido del vial se extrae directamente del fondo del tubo eppendorf, y se adiciona por la pared del tubo tapa rosca que contiene la muestra de sangre
13. Nuevamente se mezcla suavemente el tubo
14. Con el mechero prendido, se extraen del tubo 8 microlitros de la muestra positiva, y se colocan en un extremo del cuadrado que está cerca al sitio del rótulo como lo indica la figura 8.
15. Inmediatamente con la lámina extensora, por capilaridad se extiende la muestra en forma de "N", dentro del cuadro. Figura 9

**Figura 9. Forma de distribución y extendido del control positivo**



16. Con el otro tubo de sangre, se colocan 7 microlitros de la muestra en el cuadrado como se ve en la figura 10. Este será el control negativo.

**Figura 10. Forma de distribución y extendido del control negativo**



Luego se extiende la muestra como se hizo anteriormente con el control positivo

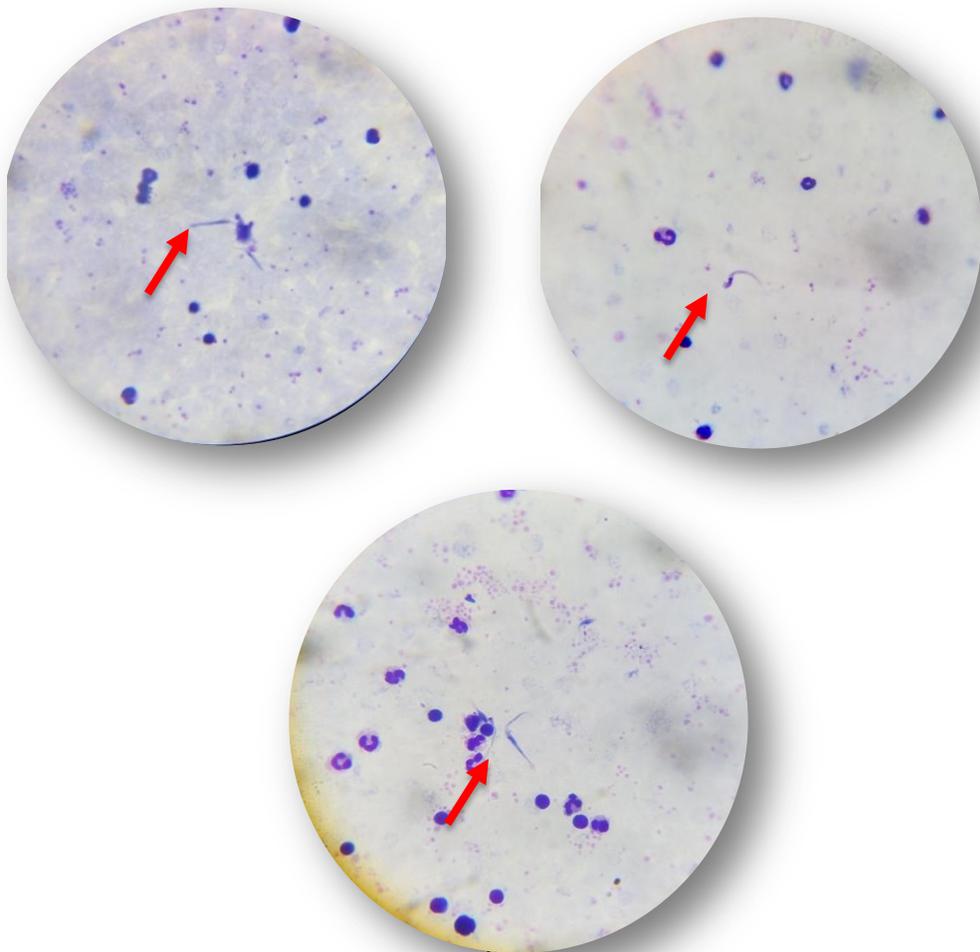
17. Se deja secar la lámina a temperatura ambiente por 40 minutos.

18. Se realiza la validación de los controles

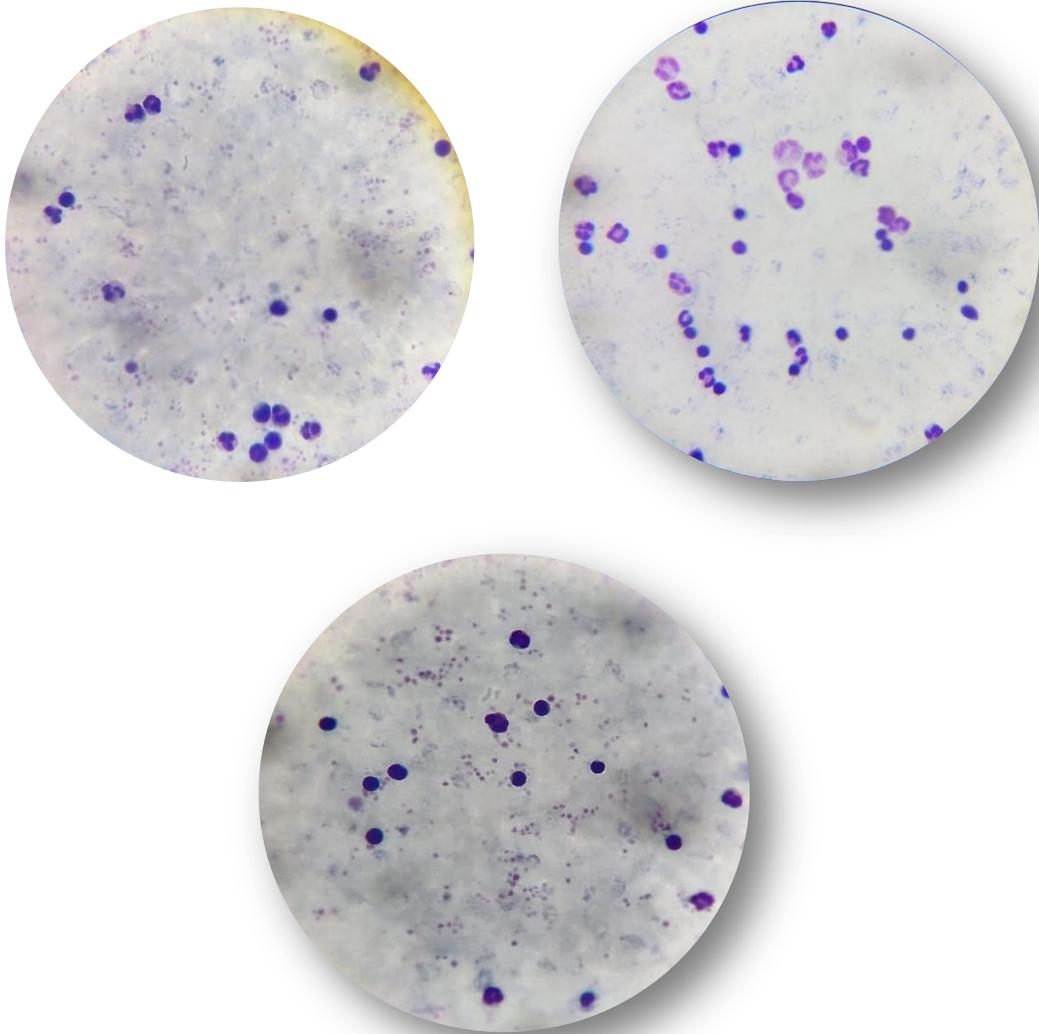
### **Validación de controles**

19. Antes de iniciar la producción se montan 2 láminas por cada control, se colorean y se hace una valoración microscópica y macroscópica.
20. En el control positivo, se verifica la presencia de 1 parásito cada 10 campos, y debe cumplir los criterios de coloración descritos anteriormente
21. En el control negativo, se verifica los criterios de coloración descritos anteriormente

**Imagen 1. Visualización microscopica del control positivo**



## Imagen 2. Visualización microscópica del control negativo



## Control de calidad del producto

22. Se toman de 3 a 5 láminas al azar por cada lote producido.
23. Se colorean en los tiempos estandarizados. Anexo 2.
24. El control de calidad consiste en dos valoraciones, una macroscópica y una microscópica.

### Valoración Macroscópica de la coloración

En la evaluación macroscópica se debe observar un cuadro de color azul claro o violeta oscuro

### Valoración Microscópica de la coloración

La evaluación microscópica consiste en la visualización de los siguientes parámetros basados en la escala sugerida por Field et al. en 1963.

Deshemoglobinización grado IV y V.

**Tabla 4. Evaluación microscópica de coloración** <sup>1,41,45</sup>

<b>Elemento o aspecto teñido</b>	<b>Color esperado</b>
Fondo de la muestra. Efecto de deshemoglobinización de los glóbulos rojos	Azul pálido, Rosado tenue, Violeta tenue
Reticulocitos	Mallas Azules
Plaquetas	Rosado fuerte a violeta con ligero punteado
Neutrófilo	Citoplasma rosado, Núcleo azul o violeta bilobulado
Linfocitos	Citoplasma azul claro, Núcleo azul o violeta fuertemente coloreado
Monocitos	Citoplasma azul ceniza, Núcleo azul ceniza no segmentado irregular

Eosinófilo	Está cubierto de granulaciones color naranja, Núcleo azul o violeta lobulado
Basófilo	Está cubierto de granulaciones color azul oscuro, Núcleo azul o violeta lobulado
Núcleo o cromatina del parásito	Rojo o violeta
Citoplasma parasitario	Azul

25. Si se cumple las características, se almacenan para su posterior distribución

26. La presentación consta de una caja en acrílico con 10 láminas sin colorear en su interior.

#### 4.5 PRUEBAS DE ESTABILIDAD DEL PRODUCTO

Las pruebas de estabilidad consistieron en verificar de cuánto tiempo las muestras fijadas en la lámina portaobjetos conservaban sus propiedades, esto con el fin de determinar su fecha de vencimiento y analizar las alteraciones que tenían durante un periodo de 6 meses.

Se desarrolló un lote piloto de 100 láminas, se utilizó la concentración  $5 \times 10^4$  parásitos por mililitro con un volumen final de 2 mililitros, se colorearon 2 láminas en diferentes periodos de tiempo.

Se verifico la calidad de deshemoglobinización y la afinidad de los colorantes hacia los leucocitos plaquetas y el parásito, se utilizaron los mismos tiempos de coloración estandarizados y se evaluó el grado de coloración. (Tabla 5)

**Tabla 5. Resultados pruebas de estabilidad del producto**

Nº de lamina	Tiempo transcurrido después de producción	Grado de coloración	Presencia del parásito
P1	1 día	5	Si
P2	1 día	5	Si
P3	2 días	5	Si
P4	2 días	5	Si

P5	1 semana	5	Si
P6	1 semana	5	Si
P7	2 semanas	5	Si
P8	2 semanas	5	Si
P9	1 mes	5	Si
P10	1 mes	5	Si
P11	1 mes y 14 días	5	Si
P12	1 mes y 14 días	5	Si
P13	2 meses	5	Si
P14	2 meses	5	Si
P15	2 meses y 14 días	5	Si
P16	2 meses y 14 días	5	Si
P17	3 meses	5	Si
P18	3 meses	5	Si
P19	3 meses y 14 días	4	Si
P20	3 meses y 14 días	4	Si
P21	4 meses	4	Si
P22	4 meses	4	Si
P23	4 meses y 14 días	4	Si
P24	4 meses y 14 días	4	Si
P25	5 meses	4	Si
P26	5 meses	4	Si
P27	5 meses y 14 días	4	Si
P28	5 meses y 14 días	4	Si
P29	6 meses	4	Si
P30	6 meses	4	Si

#### 4.6 PRESENTACION Y CARACTERISTICAS DEL PRODUCTO

La presentación del producto se definió con las siguientes características:

Caja de acrílico de tamaño 10 x 6.5 cm que contiene 10 unidades de láminas portaobjetos cada una con un control positivo y negativo

**Empaque primario:** Caja de acrílico que contiene 10 láminas control coloración Field y Giemsa.

**Empaque secundario:** Bolsa plástica con cierre Ziploc, que contiene el empaque primario

## 5. DISCUSION

En Colombia no existe en la actualidad un control de calidad comercial para coloraciones de Field y Giemsa para el diagnóstico de hemoparásitos, esto se debe principalmente porque ninguna industria colombiana se ha interesado en la producción de estos controles. Por lo tanto, existe un gran interés de los laboratorios clínicos en obtenerlos para el aseguramiento de las técnicas de coloración empleadas para la gota gruesa.

Situaciones similares a la de nuestro país se ven en otros países, viéndose que principalmente por ejemplo en Estados Unidos y algunos países de Europa<sup>14,16</sup>, los utilizan principalmente para entrenar a su personal mediante la visualización del parásito, analizando la afinidad que tienen los colorantes hacia ellos y así mismo validar su microscopía. Pero al no ser un producto con el cual se pueda comparar con las técnicas que se utilizan en Latinoamérica, no dan interés para importarlos de otros países. En este trabajo desarrollamos un producto que tiene todos los estándares que se utilizan para validar la coloración en una gota gruesa, este tiene todas las características de una gota gruesa tradicional, es decir leucocitos, plaquetas y el parásito de *Trypanosoma cruzi* en estadio de Tripomastigote.

Es importante resaltar que estas láminas de control también pueden ser material de entrenamiento para los bacteriólogos y microscopista involucrados en la prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad,<sup>23,46,47</sup>

La gota gruesa todavía en Colombia sigue siendo un método directo para la demostración del parásito causante de la enfermedad, este método puede tener una sensibilidad desde el 40 al 90 %, que puede variar dependiendo de la toma de la muestra, la calidad de la coloración y la pericia del microscopista.<sup>36,45</sup>

En la epidemiología tenemos que resaltar que no se sabe realmente cuantas personas están infectadas con el parásito, principalmente por la falta de síntomas en el paciente y por qué la mayoría de los casos reportados provienen de lugares de escasos recursos, representando así un problema de salud pública en lugares donde las enfermedades por hemoparásitos sean endémicas.<sup>24,48</sup>

En el proceso de desarrollo se utilizó varios anticoagulantes para la preservación de las muestras de sangre, además de sus características microscópicas como las

características macroscópicas, se enfrentaron pruebas piloto con EDTA y Citrato de sodio, los cuales mostraron que no diferían los resultados al momento de la coloración y deshemoglobinización, aunque el Citrato de sodio ofreció más duración de la mezcla del vial con la sangre, retrasando el proceso de hemolisis para el montaje de otro lote de láminas, reduciendo costos de producción y aprovechado al máximo la muestra.

También se pudo determinar diferentes problemas a la hora de utilizar los colorantes, como los tiempos cortos y excesivos en la pre-coloración, como en la coloración, observando principalmente problemas con el proceso de deshemoglobinización, el cual dificultaba la observación del parásito.

El proceso de deshemoglobinización es crucial al momento de la coloración, ya que este influye directamente con la visualización de la morfología del parásito, de esto se puede determinar cómo es el desempeño del azul de metileno al momento de iniciar este proceso, cabe resaltar que también se evidencio algunos inconvenientes para fijar la muestra, como el uso de metanol o tiempos excesivos de calor, ya que esto también influía en este proceso. La cantidad de sangre en la lámina, también determina el grado de la deshemoglobinización, ya que los resultados de la tabla -, mostraron que las cantidades superiores a 8.5  $\mu$ l de la muestra, no permiten una correcta deshemoglobinización, esto indica que una cantidad adecuada de muestra puede mejorar significativamente el proceso de coloración.

En el proceso de fijación de las muestras a las láminas, se determinó que dejar las láminas secando a temperatura ambiente entre 2 a 24 horas es ideales para evitar hemolisis de los glóbulos rojos y dificulte la deshemoglobinización o que se presente caída de la muestra. El Instituto Nacional de Salud recomienda fijar las láminas a 37°C por 1 minuto, aunque en este estudio la fijación por 10 minutos a esta temperatura mostro buenos resultados con sangre anticoagulada.

Para la determinación de la cantidad de parásitos por cada control positivo, se encontró que en Enfermedad de Chagas si la gota gruesa presenta 1 solo parásito en 200 campos microscópicos, se considera positivo, aunque se ha encontrado casos de parasitemias altas donde se visualizan más de 10 parásitos por campo.<sup>49</sup> Para tener un control positivo lo más cercano a la realidad, se hicieron las pruebas piloto con concentraciones que permitían ver el parásito entre 0 a 4 parásitos por campo microscópico, esto con el fin de que el usuario pudiera visualizar la

morfología del parásito en una gota gruesa. Es importante saber que el usuario puede pedir más altas concentraciones del parásito, acomodando el producto según la finalidad que tenga.

De igual manera, para la transferencia de estos resultados, se ha diseñado un inserto el cual va a ir adjunto con el producto, mencionando las características que debe cumplir en la coloración, también se ha sugerido los tiempos de coloración utilizados en las pruebas piloto, y los posibles errores que se podrían presentar desde el momento de hacer el procedimiento de la gota gruesa hasta la coloración. (Anexo 3)

Cabe resaltar que este control de calidad también asegura el diagnóstico de enfermedades con malaria, leishmania y Babesia, ya que el diagnóstico directo se utilizan las mismas coloraciones y por ende un buen rendimiento de los mismos.

## 6. CONCLUSIONES

- Se desarrolló un control de calidad comercial para coloraciones de Romanowsky modificado y Giemsa, con el fin de asegurar el diagnóstico de enfermedades parasitarias transmitidas por vectores
- Se contribuyó a estandarización interna del uso adecuado de los colorantes adoptando la recomendación del instituto nacional de salud
- Se generó la disponibilidad de láminas con presencia de *Trypanosoma cruzi* de fácil acceso como material de docencia a un bajo costo.
- Se diseñó un producto con las características de un control de calidad óptimo para el país.

## 7. RECOMENDACIONES

A partir de la elaboración de este trabajo es necesario recalcar la importancia de la gota gruesa y su respectiva coloración, como método diagnóstico directo para la determinación de diversas enfermedades causadas por hemoparasitos, y la importancia epidemiológica que lo representa, siendo un método de fácil acceso y bajo costo para zonas endémicas de estas. También es importante resaltar que estos controles de calidad sirven también para un entrenamiento óptimo para los microscopista, dando a conocer la morfología de *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la Enfermedad de Chagas, ya que en la mayoría de los casos en fase aguda no se presentan síntomas, se puede evidenciar el parásito en sangre, y no se tiene en cuenta en un diagnóstico de rutina.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Instituto Nacional de Salud - Grupo de parasitología. Guía para la vigilancia por laboratorio del *Trypanosoma cruzi* [Internet]. Vol. 1. Bogotá D.C.; 2017. Report No.: 1. Available from: [https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informacin de laboratorio/Guia para la Vigilancia por laboratorio de Trypanosoma cruzi.pdf](https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informacin%20de%20laboratorio/Guia%20para%20la%20Vigilancia%20por%20laboratorio%20de%20Trypanosoma%20cruzi.pdf)
2. Organización Panamericana de la Salud. Guía para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad de Chagas [Internet]. 3rd ed. Academia Nacional de Medicina de Argentina, editor. Washington D.C; 2018. 318–374 p. Available from: [http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/49653/9789275320433\\_spa.pdf?sequence=5&isAllowed=y](http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/49653/9789275320433_spa.pdf?sequence=5&isAllowed=y)
3. Salazar-Schettino PM, Bucio-Torres MI, Cabrera-Bravo M, de Alba-Alvarado MC, Castillo-Saldaña DR, Zenteno-Galindo EA, et al. Enfermedad de Chagas en México. *Rev la Fac Med UNAM*. 2016;59(3):6–16.
4. Behrend M, Beltrán M, Restrepo M, Kroeger A. Control de la enfermedad de Chagas en bancos de sangre de Colombia. *Biomédica* [Internet]. 2003;22(1):39. Available from: [www.ins.gov.co](http://www.ins.gov.co)
5. Pan American Health Organization. Enfermedad de Chagas en las Américas: una revisión de la situación actual de salud pública y su visión para el futuro. 2018;1–20. Available from: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&view=download&category\\_slug=informes-tecnicos-6200&alias=45142-enfermedad-chagas-americas-una-revision-situacion-actual-salud-publica-su-vision-futuro-informe-conclusiones-recomendaciones-2018-142&Itemid](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=informes-tecnicos-6200&alias=45142-enfermedad-chagas-americas-una-revision-situacion-actual-salud-publica-su-vision-futuro-informe-conclusiones-recomendaciones-2018-142&Itemid)
6. Padilla JC, Lizarazo FE, Murillo OL, Mendigaña FA, Pachón E, Vera MJ, et al. Epidemiología de las principales enfermedades transmitidas por vectores en Colombia, 1990-2016. *Biomédica* [Internet]. 2017;37(0):27. Available from: <https://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/3769>
7. Flores J, Heredia E, Martínez L, Pérez MM, Pérez MM, Alvarez N, et al. Memorias Chagas. In: Venus Zenith Meliza Carvajal Guerra MD, MD CNDM, MD JMAV, editors. *Protocolo de Vigilancia en Salud Pública - INS* [Internet]. 1st ed. Bogotá D.C.: ILadiba- Educadores en Salud; 2014. p. 42. Available from: [www.minsalud.gov.co](http://www.minsalud.gov.co)
8. Rueda K, Trujillo JE, Carranza JC, Vallejo GA. Oral transmission of

- Trypanosoma cruzi : a new epidemiological scenario for Chagas' disease in Colombia and other South American countries. *Biomedica* [Internet]. 2014;34(4):631–41. Available from: <http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/2204/2605%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25504253>
9. Belaunzarán ML. Enfermedad de Chagas: globalización y nuevas esperanzas para su cura. *Rev Argent Microbiol*. 2015;47(2):85–7.
  10. Reyes M. Riesgo de transmisión de la enfermedad de Chagas por intrusión de triatomíneos y mamíferos silvestres. *Biomedica*. 2017;37:68–78.
  11. Center for Diseases Control and Prevention C-. Ciclo de vida Trypanosoma cruzi [Internet]. *Parasites - American Trypanosomiasis*. 2015. p. 1. Available from: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/es/index.html>
  12. Melean-díaz CJ, et al. Reflexiones sobre la enfermedad de Chagas : Una vista actual. 2018;1(2):54–6.
  13. Alvis-Zakzuk NJ, Díaz DP, et al. Costs of Chagas' disease screening test in blood donors in two Colombian blood banks, 2015 |. *Biomedica*. 2015;38(1):61–8.
  14. Pan American Health Organization. Neglected Infectious Diseases (NID) [Internet]. *Health in the Americas*. 2016. p. 3. Available from: <https://www.paho.org/salud-en-las-americas-2017/?tag=dalys>
  15. Inc. ML. QC Microbiology Slides Blood Parasites Insert Product [Internet]. United States of America; 1, 2019. p. 1–4. Available from: <https://www.microbiologics.com/qc-microbiology-slides-blood-parasite-control-slide>
  16. Heelan JS, Garcia LS. A Culture of Service <sup>TM</sup> 1 Parasitology A Culture of Service <sup>TM</sup> Cases in Human Parasitology Practical Guide to Diagnostic Parasitology, 2nd Edition.
  17. Polyscience Inc. Quality Control Slides - Blood Parasites Control [Internet]. Vol. 1. Hirschberg an der Bergstrasse, Germany; 2019. Available from: <http://www.polysciences.com/default/catalog-products/life-sciences/histology-microscopy>
  18. Julieth C, Hoyos A, Mario C, Mendoza H, Escalante ME, Romero LR, et al. Detection of Natural Infection with Trypanosoma cruzi ( Trypanosomatidae ) in Triatomíneos From the Municipality of Colosó , Colombia. *Acta Biol Colomb - Univ Nac Colomb* [Internet]. 2018;24(1):180–4. Available from: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol>

19. Organizacion Mundial de la Salud. La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) [Internet]. 2018. p. 3. Available from: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
20. Renech DC, Bavio EE, Mordini OD, Bavio E, Beloscar J, Tognoni G, et al. Chagas disease in Argentina . " National registry of chagas disease of the. 2016;(January).
21. Coura R, et al. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Heal Sect Secr Leag Nations*. 2015;90(6):33–43.
22. Chatelain E. Chagas disease drug discovery: Toward a new era. *J Biomol Screen*. 2015;20(1):22–35.
23. Dias JCP, Ramos AN, Gontijo, et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. *Epidemiol e Serv saude Rev do Sist Unico Saude do Bras*. 2016;25(spe):7–86.
24. Puerta CJ, González JM, Cuéllar A, Pavia P, Llano M, Florez AC. Evaluación preliminar de la prueba comercial “Chagas (Trypanosoma cruzi) IgG-ELISA®” en individuos colombianos. *Biomédica*. 2014;34(2).
25. Palacio Betancourt D, Mendigaña F, Páez, Millán LA, Vega MP, Pablo J, et al. Ministerio de la Protección Social República de Colombia Referentes técnicos Ministerio de la Protección Social. 2010;(637):1–84. Available from: <https://www.minsalud.gov.co/Documentos y Publicaciones/Guia de atencion clinica de chagas 2010.pdf>
26. Fuentes M de V. El diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Noved en*. [Internet]. 2015;11(3):141–5. Available from: [http://amf-semfyc.com/web/downloader\\_articuloPDF.php?idart=1409&id=04\\_marzo\\_2015.pdf](http://amf-semfyc.com/web/downloader_articuloPDF.php?idart=1409&id=04_marzo_2015.pdf)
27. Coura JR. The main sceneries of chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(3):277–82.
28. Ries J, Komarek A, Gottschalk J, Brand B, Amsler L, Jutzi M, et al. A Case of Possible Chagas Transmission by Blood Transfusion in Switzerland. *Transfus Med Hemotherapy*. 2016;43(6):415–7.
29. Pavía PX. Using S35-S36 and TcH2AF-R primer-based PCR tests to follow-up a Chagas´ disease patient who had undergone a heart transplant. *Biomédica Rev del Inst Nac Salud* [Internet]. 2011;31(2):178–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22159533>

30. Alarcón de Noya B. En Venezuela la enfermedad de Chagas de transmisión oral llegó para quedarse. Trib del Investig [Internet]. 2016;17(2). Available from: <https://www.researchgate.net/publication/317015526%0AEn>
31. Organización Panamericana de la Salud. Enfermedad de Chagas en las Américas - Hoja informativa para los trabajadores de salud [Internet]. OPS - Hoja Informativa. 2018. p. 2. Available from: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=13568:chagas-in-americas-health-workers-2017&Itemid=40721&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=13568:chagas-in-americas-health-workers-2017&Itemid=40721&lang=es)
32. Chaves G, Arrieché MA-S, et al. Estimación de la demanda de medicamentos antichagásicos: una contribución para el acceso en América Latina. Pan Am J Public Heal. 2017;2:32–4.
33. Pérez Yanez LM, Gutiérrez López A, Rodríguez Blanco S, et al. Chagas disease. A threat unknown for the hearts of Latin America. Rev Cubana Med [Internet]. 2017;56(1):50–68. Available from: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85041427028&partnerID=40&md5=a00b51783d403766095b0d8272bfb708>
34. Instituto Nacional de Salud. Enfermedad de Chagas: brotes de transmisión oral en Colombia 2019 [Internet]. Vol. 33, Semanal, Boletín Epidemiológico. Bogotá D.C.; 2019. Available from: [www.ins.gov.co](http://www.ins.gov.co)
35. Instituto Nacional de Salud. Boletín Epidemiológico semana 44. Bol Epidemiol - Minist Salud [Internet]. 2018;44:1–9. Available from: [https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2018Boletín epidemiológico semana 44.pdf](https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2018Boletin%20epidemiologico%20semana%2044.pdf)
36. Instituto Nacional de Salud. Boletín Epidemiológico semana 13 de 2019 [Internet]. Bogotá D.C.; 2019. Available from: [www.ins.gov.co/boletines](http://www.ins.gov.co/boletines)
37. Mendoza NM, González NE. Evaluación del desempeño mediante paneles de láminas, una herramienta para la clasificación de los microscopistas senior del Programa de Control de Malaria en Colombia. Biomédica. 2015;35(4).
38. Lugo-Caballero CI, Dzúl-Rosado K, et al. Conocimiento de enfermedades transmitidas por vectores (dengue, rickettsiosis y enfermedad de Chagas) en médicos. Gac Med Mex. 2017;153(3):321–8.
39. Scublinsky D, Pinoni M V, Al E. Formas clínicas y diagnóstico de la enfermedad de Chagas e inmunosupresores. Rev Argent Reumatol. 2019;30(1):11–4.
40. Díaz Palmezano MJ, Rey Plazas KL, Castillo Rivera EK, Rojas Rueda PV. Enfermedad de Chagas: realidad de una patología frecuente en Santander,

- Colombia Revisión de Tema Infectología Chagas disease: reality of a frequent pathology in Santander, Colombia. Rev los Estud Med la Univ Ind Santander [Internet]. 2015;33(1):91–52. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/muis/v28n1/v28n1a08.pdf>
41. Pembele GN, Rojas L, Núñez FÁ. Insuficiencias cognoscitivas para el diagnóstico microscópico de la malaria de técnicos de la red laboratorios de Luanda, Angola. Biomédica. 2015;36(1):149–55.
  42. Instituto Nacional de Salud. Manual para el diagnostico de malaria no complicada en puestos de diagnostico y tratamiento [Internet]. Primera ed. Ministerio de Salud y Proteccion social, editor. Bogota D.C.: Milenio Editores e Impresores; 2016. 71 p. Available from: [www.ins.gov.co](http://www.ins.gov.co)
  43. Quimicos Albor I. Coloracion de Field [Internet]. Bogota D.C.; 2019. Available from: [www.quimicosalbor.com/](http://www.quimicosalbor.com/)
  44. Quimicos Albor I. Coloracion de Giemsa [Internet]. Bogota D.C.; 2019. Report No.: 1. Available from: [www.quimicosalbor.com](http://www.quimicosalbor.com)
  45. Presidencia de la Republica de Colombia. Decreto 1917 de 1994 [Internet]. Bogota; 1994. Available from: [http://www.sociedadescientificas.com/userfiles/file/DECRETOS/1917\\_94.pdf](http://www.sociedadescientificas.com/userfiles/file/DECRETOS/1917_94.pdf)
  46. Villamarin MG. Procedimientos tecnicos para el diagnostico de malaria [Internet]. Primera Ed. Secretaria de salud de Bogota, editor. Bogota D.C.: Editorial Linotipia Bolivar y Cia. S. en C.; 2009. 72 p. Available from: [www.saludcapital.gov.co](http://www.saludcapital.gov.co)
  47. Tazar J, Rojas NA, Barbosa M. Alteraciones ecocardiográficas precoces en la enfermedad de Chagas crónica sin patología demostrada. Jornadas Int Enferm Chagas [Internet]. 2017;12(3):106–10. Available from: <http://www.insuficienciacardiaca.org>
  48. Guzmán-Marín EDS, et al. La enfermedad de Chagas: retos del tratamiento. Rev Biomédica. 2016;27(3):95–6.
  49. Saumell CR, Soriano Arandes A, Solsona Díaz L, Brustenga JG, De Consenso Chagas-Aps G. Documento de consenso sobre el abordaje de la enfermedad de Chagas en Atención Primaria de salud de áreas no endémicas. Rev Pediatr en Aten Primaria [Internet]. 2015;17:1–12. Available from: [www.pap.es](http://www.pap.es)
  50. Vega S, Mendoza A, Cabrera R, Cáceres AG, et al. Primer caso de enfermedad de Chagas aguda en la Selva Central del Perú: investigación de colaterales, vectores y reservorios. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2006;23(4):288–92.

## 9. ANEXOS

### Anexo 1. Ficha técnica del producto

	<b>FORMULA MAESTRA</b>			<b>Código del documento</b>	
	<b>INDUSTRIA NACIONAL DE MICROBIOLOGIA</b>			Página <b>1</b> de	
	<b>INDEMIC S.A.S.</b>			Fecha emisión <b>2015</b>	
				No. Revisión <b>1</b>	
<b>Creado por: JAIRO IVAN ORTIZ</b>	<b>Fecha:</b> <b>JULIO</b> <b>2019</b>	<b>Revisado por:</b> <b>DIANA TAPIAS</b>	<b>Fecha:</b> <b>2019</b>	<b>Aprobado</b> <b>Por :</b> <b>DIRECCION</b> <b>TÉCNICA</b>	<b>Fecha:</b>

<b>PRODUCTO</b>	<b>LAMINAS CONTROL DE CALIDAD FIELD Y GIEMSA CON PRESENCIA MICROSCOPICA DE <i>Trypanosoma cruzi</i></b>
<b>MARCA COMERCIAL</b>	<b>INDEMIC</b>
<b>PRODUCTOR</b>	<b>INDUSTRIA NACIONAL DE MICROBIOLOGIA S.A.S</b>
<b>PAIS DE ORIGEN</b>	<b>COLOMBIA</b>
<b>COMPONENTES</b>	Caja de acrílico de tamaño 10 x 6.5 cm que contiene 10 unidades de láminas portaobjetos cada una con un control positivo y negativo
<b>VIDA UTIL</b>	Seis (6) meses
<b>EMPAQUE</b>	Empaque primario: Caja de acrílico que contiene 10 láminas control coloración Field y Giemsa. Empaque secundario: Bolsa plástica con cierre Ziploc, que contiene el empaque primario
<b>PRESENTACION COMERCIAL</b>	Caja x 10 Unidades

ESTANDARES DE CALIDAD	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Instituto Nacional de Salud - Grupo de parasitología. Guía para la vigilancia por laboratorio del Trypanosoma cruzi. Vol. 1. Bogotá D.C.; 2017. Reporte No.: 1. Available from: <a href="https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informacin%20de%20laboratorio/Gu%C3%ADa%20para%20la%20Vigilancia%20por%20laboratorio%20de%20Trypanosoma%20cruzi.pdf">https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informacin de laboratorio/Guía para la Vigilancia por laboratorio de Trypanosoma cruzi.pdf</a></li> <li>2. Ministerio de Salud - Dirección General de Promoción y Prevención. Guía de Atención de la Malaria. In: Ministerio de Salud y Protección Social, editor. Memorias Malaria [Internet]. Bogotá D.C.; 2012.</li> <li>3. Organización Mundial de la Salud. La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) [Internet]. 2018.</li> <li>4. Villamarin MG. Procedimientos técnicos para el diagnóstico de malaria [Internet]. Primera Ed. Secretaria de salud de Bogotá, editor. Bogotá D.C.: Editorial Linotipia Bolívar y Cía. S. en C.; 2009. 72 p. Available from: <a href="http://www.saludcapital.gov.co">www.saludcapital.gov.co</a></li> </ol>
INSTRUCCIONES DE DESECHO	Eliminar los elementos, utilizados según protocolos de eliminación de residuos peligrosos de la institución.
ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Utilizar el producto antes de la fecha de expiración.</li> <li>- Usar elementos de protección personal durante la manipulación y mascarilla cubierta al momento de la coloración del producto por la exposición a la inhalación de vapores.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- En caso de Realizar la coloración junto a muestras de pacientes, utilizar tapabocas con filtro de carbón, protección ocular y barreras de protección por la exposición a muestras potencialmente peligrosas.</li> </ul>
NO TA	Las muestras utilizadas para la realización de las láminas portaobjetos fueron inactivadas por lo tanto no representan ningún riesgo Biológico

	<b>FORMULA MAESTRA</b>			Código del documento	
	<b>INDUSTRIA NACIONAL DE MICROBIOLOGIA</b>			Página 1 de	
	<b>INDEMIC S.A.S.</b>			Fecha emisión 2015	
Creado por: JAIRO IVAN ORTIZ	Fecha: JULIO 2019	Revisado por: DIANA TAPIAS	Fecha: 2019	Aprobado Por : DIRECCION TÉCNICA	Fecha:

## Anexo 2. Formula maestra láminas de control de calidad

### FÓRMULA MAESTRA LAMINAS FIELD Y GIEMSA

<b>NOMBRE DEL PRODUCTO</b>	Laminas control coloración Field y Giemsa con presencia microscópica de <i>Trypanosoma cruzi</i>
<b>CODIGO</b>	LFG001
<b>CONTENIDO DE PRINCIPIO ACTIVO</b>	Sangre humana <i>Trypanosoma cruzi</i> inactivo
<b>TAMAÑO DE LOTE</b>	Mínimo 50 laminas Máximo 100 laminas
<b>LISTADO DE MATERIAS PRIMAS E INSUMOS</b>	Sangre anticoagulada, Citrato de sodio o EDTA, glóbulos rojos, Fenotipo: O RhD: positivo Vial de <i>Trypanosoma cruzi</i> diluido en PBS 1x - 500 µl Concentración 5 x10 <sup>4</sup> parásitos por mililitro - Temperatura 8°C -10°C Láminas portaobjetos con dos cuadros de 1.2 cm x 1.2 cm separados 1 cm, desengrasadas Tubos tapa rosca 20 x 125 mm estériles Tubo Falcon 12 x 3,5 cm Field Sales Fosfatadas pH 7.2 Field Azul de Metileno Fosfatado Field Solución A Field Solución B Giemsa Puntas estériles para pipeta automática Alcohol Jeringas estériles 3 mililitros

<b>LISTADO DE EQUIPOS Y MATERIALES A UTILIZAR EN EL PROCESO</b>	Pipeta automática, 100 µl Mechero Placa cóncava para coloración.
<b>CONCENTRACIÓN DEL MICROORGANISMO</b>	$5 \times 10^4$ parásitos por mililitro para 1.5 mililitros de sangre $5 \times 10^5$ parásitos por mililitro para 1.5 mililitros de sangre $5 \times 10^6$ parásitos por mililitro para 1.5 mililitros de sangre
<b>DESCRIPCIÓN DEL PROCESO</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Preparar la zona de extracción de sangre, limpia y desinfectada</li> <li>2. Extraer 2 tubos de 4 mililitros de sangre venosa fresca en tubo tapa lila (anticoagulante EDTA) o tubo tapa azul (anticoagulante Citrato de Sodio), usando el método Vacutainer.</li> <li>3. Limpiar y desinfectar la zona de preparación</li> <li>4. Sacar de la nevera un vial de parásitos concentrados y dejar a temperatura ambiente por 15 minutos</li> <li>5. Prender el mechero y preparar las láminas con cuadrados anteriormente descritos (Figura 1) Desengrase las láminas un día antes con alcohol y secar totalmente</li> </ol> <div data-bbox="683 1045 1422 1470" style="text-align: center;"> </div> <ol style="list-style-type: none"> <li>6. Mezclar suavemente un tubo con muestra sangre anticoagulada (EDTA o Citrato de sodio)</li> <li>7. En un tubo tapa rosca estéril, agregar con una jeringa, 1.5 ml de sangre anticoagulada (EDTA o Citrato de sodio)</li> <li>8. Marque el tubo con el nombre del anticoagulante utilizado, el nombre del parásito, concentración del parásito y fecha de producción.</li> <li>9. Mezclar suavemente el vial de parásitos concentrados</li> </ol>

10. Adicionar con una pipeta automática y una punta estéril, el vial de parásitos concentrados al tubo tapa rosca que contiene la sangre previamente añadida
11. Extraer el contenido del vial, directamente del fondo del tubo eppendorf, y adicionarlo por la pared del tubo tapa rosca que contiene la muestra de sangre
12. Mezclar suavemente el tubo
13. Con el mechero prendido, extraer del tubo 8 microlitros de la muestra positiva, y colocarlo en un extremo del cuadrado que está cerca al sitio del rótulo como lo indica la figura 2.

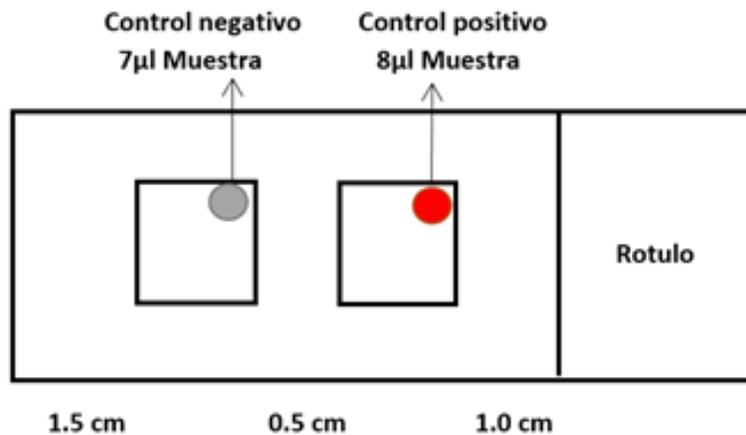


Figura 2. Ubicación de la muestra

14. Inmediatamente con la lámina extensora, por capilaridad extender la muestra en forma de "N", dentro del cuadro. Figura 3

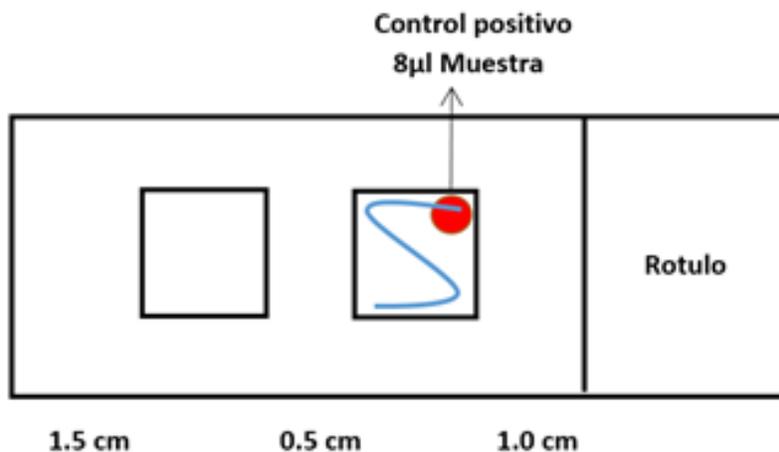


Figura 3. Forma de extendido de la muestra

15. Con el otro tubo de sangre, colocar 7 microlitros de la

muestra en el cuadrado como se ve en la figura 4. Este será el control negativo.

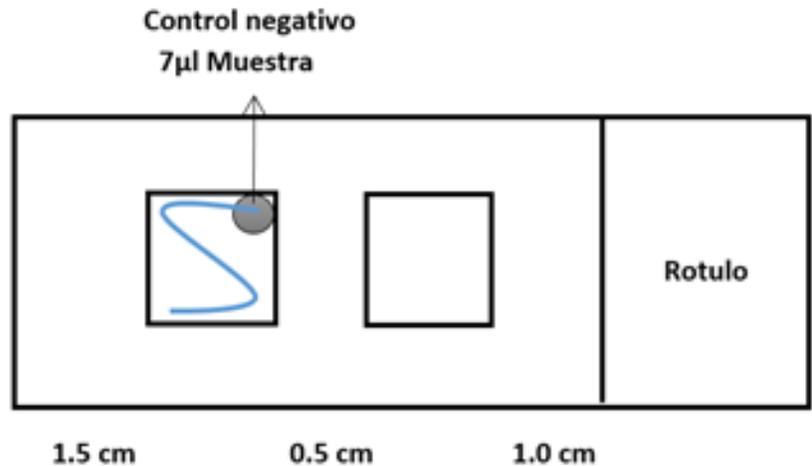


Figura 4. Forma de extendido de la muestra

16. Luego de extienda la muestra como lo hizo anteriormente con el control positivo
17. Dejar secar la lámina a temperatura ambiente por 40 minutos.
18. Alistar los reactivos según el tipo de coloración a emplear.

#### **Coloración de Romanowsky modificado (Field)**

19. Mezclar en un tubo Falcon una gota de SOLUCIÓN A y una gota de SOLUCIÓN B en 3 mililitros de SALES FOSFATADAS, por cada lámina a colorear.
20. En un tubo Falcon agregar 25 o 30 mililitros de AZUL DE METILENO FOSFATADO
21. En otro tubo Falcon agregar 25 o 30 mililitros de SALES FOSFATADAS

#### **Pre-coloración**

22. Sumergir una por una cada lámina en azul de metileno fosfatado durante 3 segundos, verificando que el reactivo toque la muestra. Este paso iniciara el proceso de deshemoglobinización.
23. Retírela y elimine el exceso de colorante colocando el extremo libre de la lámina sobre una compresa.
24. Inmediatamente sumergir la lámina en sales fosfatadas por 3

- segundos, verificando que el reactivo toque la muestra.
25. Retírela y elimine el exceso de colorante colocando el extremo libre de la lámina sobre una compresa.

### **Coloración**

26. Antes de iniciar la coloración, verifique la que la placa cóncava esté limpia, seca y sin residuos de colorante.
27. Colocar la lámina en forma invertida sobre la placa cóncava y dejar deslizar la mezcla preparada por debajo de la lámina, hasta llenar por depresión, evitando la formación de burbujas en la muestra o cerca de ella. Este paso complementa y finaliza el proceso de deshemoglobinización.
28. Dejar actuar el colorante por 9 minutos
29. Retire la lámina suavemente y dejar secar a temperatura ambiente.

### **Coloración de Giemsa**

30. Mezclar en un tubo Falcon dos gotas de GIEMSA por cada mililitro de SALES FOSFATADAS. Para 10 láminas 20 mililitros de SALES FOSFATADAS
31. En un tubo Falcon agregar 25 o 30 mililitros de AZUL DE METILENO FOSFATADO

### **Pre-coloración**

32. Sumergir una por una cada lámina en azul de metileno fosfatado durante 3 segundos, verificando que el reactivo toque la muestra. Este paso iniciara el proceso de deshemoglobinización.
33. Retírela y elimine el exceso de colorante colocando el extremo libre de la lámina sobre una compresa.

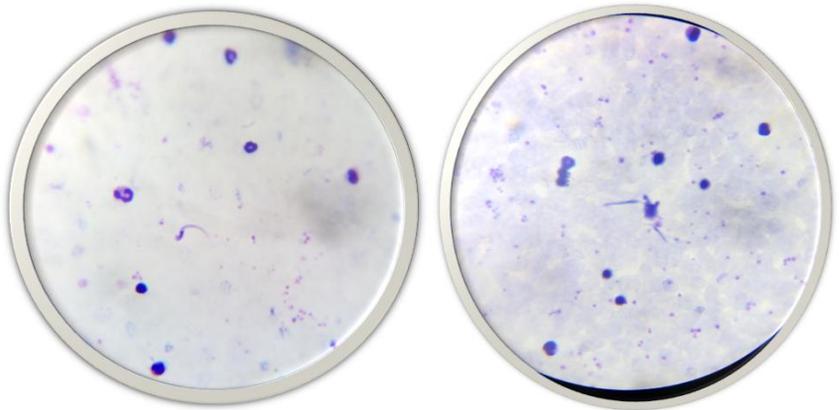
### **Coloración**

34. Antes de iniciar la coloración, verifique la que la placa cóncava esté limpia, seca y sin residuos de colorante.
35. Colocar la lámina en forma invertida sobre la placa cóncava y dejar deslizar la mezcla preparada por debajo de la lámina, hasta llenar por depresión, evitando la formación de burbujas en la muestra o cerca de ella. Este paso complementa y finaliza el proceso de deshemoglobinización.

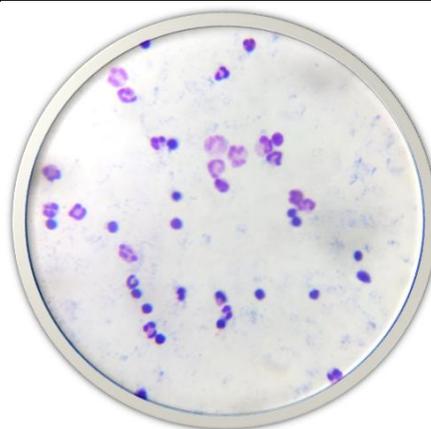
36. Dejar actuar el colorante por 6 minutos
37. Retire la lámina suavemente y lave con agua el reverso de la lámina
38. Dejar secar a temperatura ambiente.
39. Limpie las láminas con agua estéril o con alcohol diluido, para retirar los excesos de colorante al anverso y reverso de estas.
40. Luego de que las láminas se hayan secado en su totalidad, meterlas en laminarios, y almacenarlas en un lugar seco, a temperatura ambiente.
41. Observe al microscopio y valide los controles
42. Inicie el proceso de producción

### **Validación de controles**

43. En el control positivo, verifique la presencia de 1 parásito cada 10 campos, y debe cumplir los criterios de coloración descrita en este documento.
44. En el control negativo, verifique los criterios de coloración descrita en este documento.



**Control positivo**



**Control negativo**

**Control de calidad**

- 45. Se toman de 3 a 5 láminas al azar por cada lote producido.
- 46. Se colorean en los tiempos estandarizados anteriormente.
- 47. El control de calidad consiste en dos valoraciones, una macroscópica y una microscópica.

**Valoración Macroscópica de la coloración**

La evaluación macroscópica se debe un observar un cuadro de color azul claro o violeta oscuro

**Valoración Microscópica de la coloración**

La evaluación microscópica consiste en la visualización de los siguientes parámetros basados en la escala sugerida por Field et al. en 1963:

Deshemoglobinización grado III y IV.

<b>Elemento o aspecto teñido</b>	<b>Color esperado</b>
Fondo de la muestra. Efecto de deshemoglobinización de los glóbulos rojos	Azul pálido, Rosado tenue, Violeta tenue
Reticulocitos	Mallas Azules

Plaquetas	Rosado fuerte a violeta con ligero punteado
Neutrófilo	Citoplasma rosado, Núcleo azul o violeta bilobulado
Linfocitos	Citoplasma azul claro, Núcleo azul o violeta fuertemente coloreado
Monocitos	Citoplasma azul ceniza, Núcleo azul ceniza no segmentado irregular
Eosinófilo	Está cubierto de granulaciones color naranja, Núcleo azul o violeta lobulado
Basófilo	Está cubierto de granulaciones color azul oscuro, Núcleo azul o violeta lobulado
Núcleo o cromatina del parásito	Rojo o violeta
Citoplasma parasitario	Azul

Notas:

1. Por cada extendido que se realice limpiar el extremo de la lámina extensora para evitar restos de sangre coagulada al momento de realizar la siguiente gota gruesa.
2. Por cada 20 pre-coloraciones, cambiar el azul de metileno fosfatado y las sales fosfatadas
3. En caso de caída de la muestra, fijar las láminas a 37 grados por 10 min
4. En la extracción de sangre, el anticoagulante citrato de sodio mostró mejores resultados con respecto al anticoagulante EDTA.
5. Se observó en las pruebas piloto que las muestras anticoaguladas con EDTA, no permitían una correcta deshemoglobinización, evidenciando la membrana de los glóbulos rojos al momento de la valoración microscópica.
6. Las pruebas piloto se desarrollaron con tubos de extracción de sangre que estaban dentro del periodo de uso recomendado por el proveedor

	<ol style="list-style-type: none"><li>7. Se observó en la mezcla de la sangre con el vial de parásitos, tiene una duración de 4 días, se evidencia hemólisis de la muestra, lo cual no permite una correcta deshemoglobinización.</li><li>8. Se recomienda dejar 24 horas el secado de las láminas antes de iniciar la coloración, las pruebas piloto demostraron más fijación de la muestra a la lamina</li></ol>
--	--



## INDUSTRIA NACIONAL DE MICROBIOLOGIA S.A.S

[direcciontecnica@indemicsas.com](mailto:direcciontecnica@indemicsas.com)  
[www.indemicsas.com](http://www.indemicsas.com)

### LAMINAS CONTROL COLORACION FIELD Y GIEMSA CON PRESENCIA MICROSCOPICA DE *Trypanosoma cruzi*

#### USO PROPUESTO:

Las láminas para el control de calidad de Field y Giemsa son un método cualitativo que se utiliza con el fin de asegurar al laboratorio clínico, el correcto funcionamiento de los colorantes y de la técnica utilizada, el objetivo es evidenciar la presencia del parásito de *Trypanosoma cruzi* en estadio de tripomastigote y de esta forma realizar un diagnóstico veraz.

#### PRINCIPIO DEL METODO:

Las láminas para el control de calidad de coloración de Field y Giemsa son un portaobjetos con dos cuadrados, simulando una gota gruesa con las indicaciones del Instituto Nacional de Salud. Uno de ellos contiene el control positivo, éste es realizado con la presencia del parásito de *Trypanosoma cruzi*, este control está hecho de tal forma que tiene las mismas características de una muestra de sangre capilar y venosa es decir leucocitos, plaquetas y una completa deshemoglobinización y el parásito en estadio de Tripomastigote característico de la enfermedad de Chagas en fase aguda. El otro cuadrado contiene el control negativo que es realizado con las mismas características de una muestra de sangre capilar y venosa es decir leucocitos, plaquetas y una completa deshemoglobinización.

#### PRESENTACION:

Caja en acrílico que contiene 10 unidades de láminas portaobjetos, cada una con un control positivo y negativo.

#### MATERIALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS:

Para el uso de las láminas de control de calidad, debe contar con:

- Colorantes gota gruesa (Field, Giemsa)

- Mechero
- Microscopio
- Aceite de inmersión

#### INSTRUCCIONES DE USO:

Las láminas portaobjetos de gota gruesa sin colorear, según la escala adoptada nacionalmente para el informe de los resultados suministrados por la Industria Nacional de Microbiología, deben ser coloreadas de la misma forma que las láminas de gota gruesa para diagnóstico, no requieren fijación, ni inactivación. Una vez coloreadas, realice la respectiva lectura al microscopio y valore la coloración.

Se utiliza al momento de realizar una coloración para una gota gruesa de rutina, se colorean simultáneamente con las muestras clínicas.

#### CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO:

Las láminas portaobjetos de control de calidad de la coloración de Field y Giemsa deben ser almacenadas a temperatura ambiente, en un lugar seco, fresco, y alejadas de la luz, en la caja suministrada. Siguiendo estas instrucciones las láminas tienen una vida útil de seis meses. (POR CONFIRMAR)

#### RESULTADOS ESPERADOS

Al utilizar las láminas portaobjetos de gota gruesa, según la escala adoptada nacionalmente para el informe de resultados se debe obtener en su lectura microscópica los siguientes parámetros de coloración según lo establecido en la lámina:

Elemento o aspecto teñido	Color esperado
Fondo de la muestra. Efecto de deshemoglobinización de los glóbulos rojos	Azul pálido, Rosado tenue, Violeta tenue
Reticulocitos	Mallas Azules
Plaquetas	Rosado fuerte a violeta con ligero punteado
Neutrófilo	Citoplasma rosado, Núcleo azul o violeta bilobulado
Linfocitos	Citoplasma azul claro,

	Núcleo azul o violeta fuertemente coloreado
Monocitos	Citoplasma azul ceniza, Núcleo azul ceniza no segmentado irregular
Eosinófilo	Está cubierto de granulaciones color naranja, Núcleo azul o violeta lobulado
Basófilo	Está cubierto de granulaciones color azul oscuro, Núcleo azul o violeta lobulado
Núcleo o cromatina del parásito	Rojo o violeta
Citoplasma parasitario	Azul

#### CONTROL DE CALIDAD

Las láminas para el control de calidad de coloración de Field y Giemsa son preparadas bajo estándares nacionales, siguiendo los lineamientos recomendados por el Instituto nacional de salud; cada lote es controlado rigurosamente, realizando un muestreo aleatorio equivalente al 10 por ciento del tamaño del lote al cual se le realiza la respectiva coloración verificando que cumpla con los resultados esperado.

#### LIMITACIONES DEL METODO:

Las láminas para el control de calidad se pueden ver afectadas si no son utilizadas correctamente debido a:

1. Defectos en la realización de la coloración, tiempos deficientes o excesivos en el proceso de pre-coloración, que puede causar una incorrecta deshemoglobinización y una posterior destrucción de las estructuras parasitarias.
2. Defectos en la lectura, como: uso de microscopio en mal estado, lectura de un número insuficiente de campos, observación de 1 solo nivel del extendido, poco entrenamiento.

#### PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS:

Las láminas para el control de calidad de la coloración de Field y Giemsa, no representan ningún tipo de riesgo biológico ya que el

material utilizado en su proceso de elaboración ha sido debidamente inactivado. Una vez utilizadas, las láminas deben ser descartadas en un guardián de bioseguridad.

**Referencias:**

1. Instituto Nacional de Salud - Grupo de parasitología. Guía para la vigilancia por laboratorio del Trypanosoma cruzi [Internet]. Vol. 1. Bogotá D.C.; 2017. Report No.: 1. Available from: [https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informacion de laboratorio/Guia para la Vigilancia por laboratorio de Trypanosoma cruzi.pdf](https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informacion%20de%20laboratorio/Guia%20para%20la%20vigilancia%20por%20laboratorio%20de%20Trypanosoma%20cruzi.pdf)
2. Organización Panamericana de la Salud. Guía para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad de Chagas [Internet]. 3rd ed. Academia Nacional de Medicina de Argentina, editor. Washintong D.C; 2018. 318–374 p. Available from: [http://iris.paho.org/xmliui/bitstream/handle/123456789/49653/9789275320433\\_spa.pdf?sequence=5&isAllowed=y](http://iris.paho.org/xmliui/bitstream/handle/123456789/49653/9789275320433_spa.pdf?sequence=5&isAllowed=y)
3. Salazar-Schettino PM, Bucio-Torres MI, Cabrera-Bravo M, de Alba-Alvarado MC, Castillo-Saldaña DR, Zenteno-Galindo EA, et al. Enfermedad de Chagas en México. Rev la Fac Med UNAM. 2016;59(3):6–16.
4. Behrend M, Beltrán M, Restrepo M, Kroeger A. Control de la enfermedad de Chagas en bancos de sangre de Colombia. Biomédica [Internet]. 2003;22(1):39. Available from: [www.ins.gov.co](http://www.ins.gov.co)
5. Pan American Health Organization. Enfermedad de Chagas en las Américas : una revisión de la situación actual de salud pública y su visión para el futuro . 2018;1–20. Available from: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&view=download&category\\_slug=informes-tecnicos-6200&alias=45142-enfermedad-chagas-americas-una-revision-situacion-actual-salud-publica-su-vision-futuro-informe-conclusiones-recomendaciones-2018-142&Itemid](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=informes-tecnicos-6200&alias=45142-enfermedad-chagas-americas-una-revision-situacion-actual-salud-publica-su-vision-futuro-informe-conclusiones-recomendaciones-2018-142&Itemid)
6. Padilla JC, Lizarazo FE, Murillo OL, Mendigaña FA, Pachón E, Vera MJ, et al. Epidemiología de las principales enfermedades transmitidas por vectores en Colombia, 1990-2016. Biomédica [Internet]. 2017;37(0):27. Available from: <https://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/3769>
7. Flores J, Heredia E, Martínez L, Pérez MM, Pérez MM, Alvarez N, et al. Memorias Chagas. In: Venus Zenith Meliza Carvajal Guerra MD, MD CNDM, MD JMAV, editors. Protocolo de Vigilancia en Salud Pública - INS [Internet]. 1st ed. Bogotá D.C.: ILadiba- Educadores en Salud; 2014. p. 42. Available from: [www.minsalud.gov.co](http://www.minsalud.gov.co)
8. Rueda K, Trujillo JE, Carranza JC, Vallejo GA. Oral transmission of Trypanosoma cruzi : a new epidemiological scenario for Chagas' disease in Colombia and other South American countries. Biomédica [Internet]. 2014;34(4):631–41. Available from: <http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/2204/2605%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25504253>
9. Belaunzarán ML. Enfermedad de Chagas: globalización y nuevas esperanzas para su cura. Rev Argent Microbiol. 2015;47(2):85–7.
10. Reyes M. Riesgo de transmisión de la enfermedad de Chagas por intrusión de triatominos y mamíferos silvestres. Biomédica. 2017;37:68–78.
11. Center for Diseases Control and Prevention C-. Ciclo de vida Trypanosoma cruzi [Internet]. Parasites - American Trypanosomiasis. 2015. p. 1. Available from: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/es/index.html>
12. Melean-diaz CJ, et al. Reflexiones sobre la enfermedad de Chagas : Una vista actual. 2018;1(2):54–6.
13. Alvis-Zakzuk NJ, Díaz DP, et al. Costs of Chagas' disease screening test in blood donors in two Colombian blood banks, 2015 [J. Biomédica. 2015;38(1):61–8.
14. Pan American Health Organization. Neglected Infectious Diseases (NID) [Internet]. Health in the Americas. 2016. p. 3. Available from: <https://www.paho.org/salud-en-las-americas-2017/?tag=dalys>
15. Inc. ML. QC Microbiology Slides Blood Parasites Insert Product [Internet]. United States of America; 1, 2019. p. 1–4. Available from: <https://www.microbiologics.com/qc-microbiology-slides-blood-parasite-control-slide>
16. Heelan JS, Garcia LS. A Culture of Service™ 1 Parasitology A Culture of Service™ Cases in Human Parasitology Practical Guide to Diagnostic Parasitology, 2nd Edition.
17. Polyscience Inc. Quality Control Slides - Blood Parasites Control [Internet]. Vol. 1. Hirschberg an der Bergstrasse, Germany; 2019. Available from: <http://www.polysciences.com/default/catalog-products/life-sciences/histology-microscopy>
18. Julieth C, Hoyos A, Mario C, Mendoza H, Escalante ME, Romero LR, et al. Detection of Natural Infection with Trypanosoma cruzi ( Trypanosomatidae ) in Triatomines From the Municipality of Colosó , Colombia. Acta Biol Colomb - Univ Nac Colomb [Internet]. 2018;24(1):180–4. Available from: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol>
19. Organización Mundial de la Salud. La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) [Internet]. 2018. p. 3. Available from: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
20. Reneth DC, Bavio EE, Mordini OD, Bavio E, Beloscar J, Tognoni G, et al. Chagas disease in Argentina . " National registry of chagas disease of the. 2016;(January).
21. Coura R, et al. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. Heal Sect Secr Leag Nations. 2015;90(6):33–43.
22. Chatelain E. Chagas disease drug discovery: Toward a new era. J Biomol Screen. 2015;20(1):22–35.
23. Dias JCP, Ramos AN, Gontijo, et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. Epidemiol e Serv saude Rev do Sist Unico Saude do Bras. 2016;25(spe):7–86.
24. Puerta CJ, González JM, Cuéllar A, Pavia P, Llano M, Florez AC. Evaluación preliminar de la prueba comercial "Chagas (Trypanosoma cruzi) IgG-ELISA\*" en individuos colombianos. Biomédica. 2014;34(2).
25. Palacio Betancourt D, Mendigaña F, Páez, Millán LA, Vega MP, Pablo J, et al. Ministerio de la Protección Social República de Colombia Referentes técnicos Ministerio de la Protección Social. 2010;(637):1–84. Available from: [https://www.minsalud.gov.co/Documentos y Publicaciones/Guia de atencion clinica de chagas 2010.pdf](https://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/Guia%20de%20atencion%20clinica%20de%20chagas%2010.pdf)
26. Fuentes M de V. El diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Noved en. [Internet]. 2015;11(3):141–5. Available from: [http://amf-semfyc.com/web/downloader\\_articuloPDF.php?idart=1409&id=04\\_marzo\\_2015.pdf](http://amf-semfyc.com/web/downloader_articuloPDF.php?idart=1409&id=04_marzo_2015.pdf)
27. Coura JR. The main sceneries of chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015;110(3):277–82.
28. Ries J, Komarek A, Gottschalk J, Brand B, Amsler L, Jutzi M, et al. A Case of Possible Chagas Transmission by Blood Transfusion in Switzerland. Transfus Med Hemotherapy. 2016;43(6):415–7.
29. Pavia PX. Using S35-S36 and TcH2AF-R primer-based PCR tests to follow-up a Chagas' disease patient who had undergone a heart transplant. Biomédica Rev del Inst Nac Salud [Internet]. 2011;31(2):178–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22159533>
30. Alarcón de Noya B. En Venezuela la enfermedad de Chagas de transmisión oral llegó para quedarse. Trib del Investig [Internet]. 2016;17(2). Available from: <https://www.researchgate.net/publication/317015526%0AEn>
31. Organización Panamericana de la Salud. Enfermedad de Chagas en las Américas - Hoja informativa para los trabajadores de salud [Internet]. OPS - Hoja Informativa. 2018. p. 2. Available from: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=13568:chagas-in-americas-health-workers-2017&Itemid=40721&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=13568:chagas-in-americas-health-workers-2017&Itemid=40721&lang=es)
32. Chaves G, Arrieche MA-S, et al. Estimación de la demanda de medicamentos antichagasicos: una contribución para el acceso en América Latina. Pan Am J Public Heal. 2017;2:32–4.
33. Pérez Yanez LM, Gutiérrez López A, Rodríguez Blanco S, et al. Chagas disease. A threat unknown for the hearts of latin America. Rev Cubana Med [Internet]. 2017;56(1):50–68. Available from: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85041427028&partnerID=40&md5=a00b51783d403766095b0d8272bfb708>
34. Instituto Nacional de Salud. Enfermedad de chagas : brotes de transmisión oral en Colombia 2019 [Internet]. Vol. 33, Semanal, Boletín Epidemiológico. Bogotá D.C.; 2019. Available from: [www.ins.gov.co](http://www.ins.gov.co)
35. Instituto Nacional de Salud. Boletín Epidemiológico semana 44. Bol Epidemiol - Minist Salud [Internet]. 2018;44:1–9. Available from: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2018> Boletín epidemiológico semana 44.pdf
36. Instituto Nacional de Salud. Boletín Epidemiológico semana 13 de 2019 [Internet]. Bogotá D.C.; 2019. Available from: [www.ins.gov.co/boletines](http://www.ins.gov.co/boletines)
37. Mendoza NM, González NE. Evaluación del desempeño mediante paneles de láminas, una herramienta para la clasificación de los microscopistas senior del Programa de Control de Malaria en Colombia. Biomédica. 2015;35(4).
38. Lugo-Caballero CI, Dzul-Rosado K, et al. Conocimiento de enfermedades transmitidas por vectores (dengue, rickettsiosis y enfermedad de Chagas) en médicos. Gac Med Mex. 2017;153(3):321–8.
39. Scublinsky D, Pinoin M V, Al E. Formas clínicas y diagnóstico de la enfermedad de Chagas e inmunosupresores. Rev Argent Reumatol. 2019;30(1):11–4.
40. Díaz Palmezano MJ, Rey Plazas KL, Castillo Rivera EK, Rojas Rueda PV. Enfermedad de chagas: realidad de una patología frecuente en Santander, Colombia Revisión de Tema Infectología Chagas disease: reality of a frequent pathology in Santander, Colombia. Rev Sol Estud Med la Univ Ind Santander [Internet]. 2015;33(1):91–52. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/muis/v28n1/v28n1a08.pdf>
41. Pembele GN, Rojas L, Núñez FÁ. Insuficiencias cognitivas para el diagnóstico microscópico de la malaria de técnicos de la red laboratorios de Luanda, Angola. Biomédica. 2015;36(1):149–55.
42. Instituto Nacional de Salud. Manual para el diagnóstico de malaria no complicada en puestos de diagnóstico y tratamiento [Internet]. Primera ed. Ministerio de Salud y Protección social, editor. Bogotá

- D.C.: Milenio Editores e Impresores; 2016. 71 p. Available from: [www.ins.gov.co](http://www.ins.gov.co)
43. Químicos Albor I. Coloración de Field [Internet]. Bogotá D.C.; 2019. Available from: [www.quimicosalbor.com/](http://www.quimicosalbor.com/)
  44. Químicos Albor I. Coloración de Giemsa [Internet]. Bogotá D.C.; 2019. Report No.: 1. Available from: [www.quimicosalbor.com](http://www.quimicosalbor.com)
  45. Presidencia de la República de Colombia. Decreto 1917 de 1994 [Internet]. Bogotá; 1994. Available from: <http://www.sociedadescientificas.com/userfiles/file/DECRETOS/191794.pdf>
  46. Villamarín MG. Procedimientos técnicos para el diagnóstico de malaria [Internet]. Primera Ed. Secretaría de salud de Bogotá, editor. Bogotá D.C.: Editorial Linotipia Bolívar y Cia. S. en C.; 2009. 72 p. Available from: [www.saludcapital.gov.co](http://www.saludcapital.gov.co)
  47. Tazar J, Rojas NA, Barbosa M. Alteraciones ecocardiográficas precoces en la enfermedad de Chagas crónica sin patología demostrada. *Jornadas Int Enferm Chagas* [Internet]. 2017;12(3):106–10. Available from: <http://www.insuficienciacardiaca.org>
  48. Guzmán-Marín EDS, et al. La enfermedad de Chagas: retos del tratamiento. *Rev Biomédica*. 2016;27(3):95–6.
  49. Saumell CR, Soriano Arandes A, Solsona Díaz L, Brustenga JG, De Consenso Chagas-Aps G. Documento de consenso sobre el abordaje de la enfermedad de Chagas en Atención Primaria de salud de áreas no endémicas. *Rev Pediatr en Aten Primaria* [Internet]. 2015;17:1–12. Available from: [www.pap.es](http://www.pap.es)
  50. Vega S, Mendoza A, Cabrera R, Cáceres AG, et al. Primer caso de enfermedad de Chagas aguda en la Selva Central del Perú: investigación de colaterales, vectores y reservorios. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2006;23(4):288–92.
2. Ministerio de Salud - Dirección General de Promoción y Prevención. Guía de Atención de la Malaria. In: Ministerio de Salud y Protección Social, editor. *Memorias Malaria* [Internet]. Bogotá D.C.; 2012.
  3. Organización Mundial de la Salud. La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) [Internet]. 2018.
  4. Ortiz J, Tapias D. Desarrollo de láminas para el control de calidad de las coloraciones derivadas de Romanowsky utilizadas en el diagnóstico directo de *Trypanosoma cruzi*. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; 2019.

