

## ENFERMEDAD DE CHAGAS: EVALUACIÓN DE ESTUCHES COMERCIALES PARA EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO.

Dres. Luis Briceño<sup>1</sup>, Eva Mary Rodríguez<sup>2</sup>, Meudy Medina<sup>3</sup>, Adriana Paredes<sup>1</sup>,  
\*Graciela León<sup>4</sup>, Meilyn Hung<sup>4</sup> y Walter Mosca<sup>1</sup>.

### RESUMEN

La enfermedad de Chagas representa un importante problema de salud pública en la mayor parte de los países de Latinoamérica. Se estima que alrededor de 13 millones de personas se encuentran infectadas en nuestro continente, las cuales al migrar por razones socioeconómicas

entre otras, podrían transmitir la enfermedad como potenciales donadores de sangre. La vía transfusional es la segunda causa en importancia para contraer la enfermedad y en la actualidad, se están realizando enormes esfuerzos por mejorar los sistemas de detección en los bancos de sangre de todo el continente (incluyendo EEUU y Canadá). Debido a problemas importantes para realizar el diagnóstico serológico de la enfermedad, en países como Brasil, los bancos de sangre realizan obligatoriamente su despistaje, utilizando al menos dos métodos diferentes. En nuestro país, existe un 100% de cobertura del tamizaje, con una sola prueba de ELISA comercial. Dadas las implicaciones que podría tener el empleo de una sola prueba, el presente trabajo presenta una evaluación de los principales estuches comerciales que se emplean en el país. Arch Hosp Vargas 2003; 45(3-4): 35-42.

---

1. Laboratorio de Fisiopatología, Instituto de Biomedicina, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

2. Unidad de Investigación y Control de Enfermedades Endémicas Sanare, Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

3. Dirección de Salud Ambiental y Contraloría Sanitaria, Maracay, Ministerio de Salud y Desarrollo Social.

4. Banco Municipal de Sangre, DF.

Este trabajo fue subvencionado en parte por el proyecto FONACIT G2000001530 y FONACIT BTS-51.

*Palabras claves:* Chagas, diagnóstico, estuches comerciales.

## ABSTRACT

Chagas disease is an important public health problem in Latin American. According to Tropical Disease Research (TDR) an estimated 13 million people are infected, probably due to migration and immigration of people leading to a spread of the disease. The second most common route of transmission in humans is blood transfusion, and at the present time, there are numerous efforts to improve the detection systems in the blood banks of the whole continent (including USA and Canada). Due to significant problems in the serum diagnosis of the illness, in countries like Brazil, it is mandatory for blood banks to screen donors for Chagas disease using at least two tests.

In our country, there is a 100% serological screening, but using a single test, frequently a commercial kit. Given the implications that this may carry the present study presents the evaluation of the most commonly used commercial kits used in Venezuela.

*Key Words:* Chagas, diagnosis, commercial kit.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, un problema importante de salud pública es producida por el *Trypanosoma cruzi*, parásito flagelado del orden Kinetoplastidae. En el 2003, el TDR<sup>1</sup> reportó una incidencia de doscientas mil personas por año y una prevalencia de 13 millones de personas infectadas, de las cuales 3,3 millones presentan sintomatología y alrededor del 25% de la población de Centro y Suramérica está en riesgo de contraerla<sup>2</sup>.

La infección se adquiere principalmente por vía vectorial. La vía transfusional es la segun-

da en importancia y en la actualidad conjuntamente con las iniciativas adelantadas por los países del cono sur para controlar la transmisión vectorial, se están realizando enormes esfuerzos por mejorar los sistemas de detección en los bancos de sangre de todo el continente<sup>3</sup>, para así lograr un control de la transmisión de esta enfermedad.

El diagnóstico parasitológico durante la fase crónica de la enfermedad presenta bajos niveles de sensibilidad, con técnicas que consumen mucho tiempo y recursos<sup>4</sup>. En el futuro mediato, las pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), representarán una alternativa válida para solventar este problema. El diagnóstico serológico es la forma más empleada y los antígenos que frecuentemente se han usado, presentan problemas importantes de reacciones falsas. Para solventar estos problemas, en algunos países como Brasil, los bancos de sangre realizan obligatoriamente su despistaje, con al menos dos tipos de pruebas diferentes para el despistaje.

Desde el punto de vista técnico, se han desarrollado pruebas serológicas con combinaciones de proteínas recombinantes, las cuales han mejorado la sensibilidad y especificidad<sup>6,7</sup>. Sin embargo, pese a las mejoras implementadas, en el 2003 se reportaron casos de falsos negativos (Fn) que alcanzaron el 2,1%<sup>8</sup>, en instituciones que emplearon al menos dos pruebas serológicas, tal como recomienda la Organización Mundial de la Salud<sup>9</sup>.

Venezuela fue pionera en el continente al aprobar una legislación que obliga el despistaje serológico para la enfermedad de Chagas de los donantes de sangre. La prueba más empleada fue la técnica de fijación de complemento, Machado Guerreiro, la cual presentaba niveles de sensibilidad y especificidad que fluctuaban entre el 80 y 90 %. Actualmente, el tamizaje se realiza con una cobertura del 100 %, con una prueba de ELISA

comercial. Sin embargo, aún cuando esta iniciativa ha mejorado los niveles de sensibilidad, es necesario realizar un seguimiento estrecho de los estuches que se están adquiriendo. En los últimos años, grupos de investigadores han llamado la atención respecto a los estuches comerciales que se emplean para el diagnóstico de la enfermedad en los bancos de sangre<sup>10</sup> y en los últimos tres años, las autoridades de salud han cambiado las casas comerciales escogidas.

Sobre la base de los problemas que se presentan para el diagnóstico de esta enfermedad y las implicaciones que pudiesen presentarse por el empleo de una sola prueba, el presente trabajo tiene como objetivo realizar una evaluación de los tres estuches comerciales más empleados por los bancos de sangre del país, y de una prueba de ELISA experimental desarrollada en nuestro laboratorio, con antígenos de bajo costo y fácil implementación.

## MÉTODOS

**Sueros:** Los estuches fueron analizados con sueros de individuos provenientes de zonas endémicas, que denominaremos como grupo I y con sueros de pacientes con enfermedades que frecuentemente dan reacciones falsas positivas (Fp), como grupo II. El grupo I, estuvo conformado por un total de 287 sueros, obtenidos previo consentimiento de voluntarios que residen en el Municipio Andrés Bello, del Estado Lara, zona endémica para la enfermedad. Como referencia (patrón oro) se empleó el diagnóstico realizado por la Dirección de Salud Ambiental y Contraloría Sanitaria, Maracay, MSDS, donde los sueros son analizados por tres metodologías diferentes (ELISA, hemaglutinación indirecta, e inmunofluorescencia). De ellos, 195 sueros (Verdaderos negativos.Vn) fueron clasificados como negativos

y 92 (Verdaderos positivos. Vp) como positivos, escogidos para que existiera aproximadamente una proporción de 2:1, entre negativos y positivos.

Por falta de disponibilidad, dos de los estuches fueron evaluados con un número menor de sueros (227) de los cuales 161 eran sueros negativos y 66 positivos.

Para analizar la reactividad cruzada que pudiesen presentar los sueros de otras enfermedades con antígenos de *T. cruzi*, se emplearon un total de 142 sueros. Con este grupo 11 de sueros se evaluó este aspecto, donde los pacientes fueron clínica y parasitológicamente confirmados:

Leishmaniasis cutánea Americana (n=26), Leishmaniasis visceral (n=57). Malaria (n=30), Esquistosomiasis (n=20), Toxoplasmosis (n=10).

**Pruebas de ELISA:** Los estuches comerciales evaluados fueron: BioKIT@(España), Bioschile Ingeniería Genética S.A@(Chile) y Pharmatest@(Venezuela). Además de los estuches comerciales, también se evaluó una prueba experimental de bajo costo, como alternativa para la introducción de una prueba adicional en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Esta prueba, con sueros bien caracterizados, demostró óptimos niveles de sensibilidad y especificidad. (Figura 1).

El análisis de las pruebas comerciales se realizó en el Banco Municipal de Sangre del DC y la prueba experimental fue desarrollada en el Laboratorio de Fisiopatología del Instituto de Biomedicina.

Las pruebas comerciales fueron realizadas todas por el mismo operario y según las indicaciones del fabricante. Para la ejecución de la prueba de ELISA experimental se emplearon placas Maxisorp, Nunc, las cuales fueron sensibilizadas con formas epimastigotes modificadas (1flg/ml)

durante toda la noche, en buffer carbonato. Los sueros fueron evaluados a una dilución 1/100, por 30 minutos, a 37°C. La reacción antígeno-anticuerpo fue detectada mediante el empleo de un conjugado anti inmunoglobulina G (IgG) humana acoplada a la enzima fosfatasa alcalina (KPL). El revelado de la prueba se realizó en buffer dietanolamina (PIERCE), conteniendo como sustrato ortofenilfosfato (1mg/ml) de PIERCE. La intensidad de color desarrollado, fue leída a 405nm, en un lector de ELISA (Multiskan Ex, Labsystems).

**Análisis de los resultados:** La sensibilidad se determinó sobre la base del número de sueros verdaderos positivos (Vp) detectados por la prueba "patrón oro" entre la suma de los sueros Vp, con los falsos negativos (Fn) que se registraron para la prueba (sensibilidad =  $Vp / Vp + Fn$ ).

De igual manera con los sueros que resultaron negativos, se calcularon los niveles de especificidad a partir de los sueros evaluados en zonas endémicas (Esp =  $Vn / Vn + Fp$ ).

Para los cálculos de especificidad realizados con los sueros de pacientes con otras enfermedades, (grupo II de sueros), arbitrariamente consideramos que si alguna de las pruebas evaluadas al analizar un suero resultaba negativa (como debe esperarse), este suero debería ser negativo para las otras pruebas, por tal razón, solo fueron considerados los sueros que resultaron negativos con al menos una de las cuatro pruebas evaluadas.

Los sueros estudiados del grupo TI provienen de pacientes que se encuentran en zonas endémicas también para la enfermedad de Chagas, por lo que podría esperarse la existencia de infecciones mixtas. En tal sentido, las muestras que dieron positivas con todas las pruebas no fueron incluidas para el cálculo de especificidad, al no disponerse de pruebas que confirmaran la

posibilidad de infección mixta, lo que podría ocasionar una distorsión en los valores de especificidad.

El análisis estadístico fue realizado con el programa GraphPad InStat 3.02 (GraphPad software, San Diego, CA: <http://www.graphpad.com>)

## RESULTADOS

### Análisis de las pruebas comerciales con los sueros del grupo 1:

Para evaluar la sensibilidad y especificidad de los tres estuches comerciales y la prueba experimental, se emplearon muestras de sueros de individuos que viven en una zona endémica.

De las cuatro pruebas evaluadas, la prueba experimental fue la que presentó mayores niveles de sensibilidad (Tabla 1) seguido de los estuches comerciales BioKIT y Bioschile. El nivel más bajo se obtuvo con el estuche de Pharmatest con un 95,65%.

Respecto a los niveles de especificidad, la prueba experimental y el estuche de Pharmatest presentaron los mejores niveles (98,8 y 98,77%; respectivamente), observándose la siguiente secuencia: Experimental>Pharmatest>Bioschile>BioKIT (Tabla I).

### Evaluación de los estuches comerciales con el grupo n de sueros:

Uno de los problemas importantes para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, es la reactividad cruzada que presentan los antígenos de *T. cruzi* con anticuerpos de pacientes con otras enfermedades<sup>11-13</sup>. Los resultados destacan que la prueba con mejores niveles fue la experimental (Tabla II), seguido de Biokit, Bioschile y con menor especificidad Pharmatest. La mayor frecuencia de reactividad cruzada se presentó con los sueros de pacientes con Leishmaniasis, particular-

Tabla 1. Comparación de los resultados obtenidos con los sueros del el grupo 1 entre los estuches comerciales y la prueba experimental.

	Total	Negativos	Positivos	Dudoso	Fp	Fn	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Patrón oro	287	195	92	--	--	--	---	---
BlosCHILE@	287	193	94	0	4	2	97,87	97,97
Pharmatest@	227	*162/161	*65/66	0	2	3	95,65	98,77
BIOKIT@	227	*154/161	*73/66	0	8	1	98,50	95,26
Experimental	287	193	93	1	2	1	98,92	98,98

Fp: Resultado falso positivo.

Fn: Resultado falso negativo.

\*Valor obtenido / V positivo ó V negativo, respecto a la prueba estándar.

Tabla II. Comparación de los estuches comerciales y la prueba experimental con sueros del grupo n.

	Especificidad (%) Leishmaniasis	Especificidad con todas las enfermedades (%)
BlosCHILE@	92 / 89,47	94,36
Pharmatest@	76 / 78,47	86,99
BIOKIT@	90,47 / 89,47	96,77
Experimental	100 / 98,24	98,59

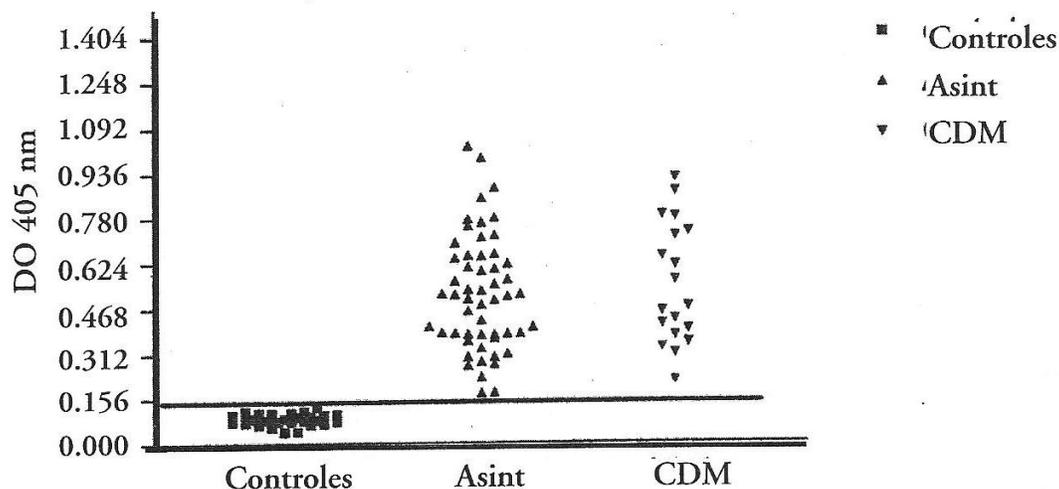
% de Especificidad con Leishmaniasis Americana / % de Especificidad con Leishmaniasis visceral.

mente con los de Leishmaniasis visceral. El estuche de Pharmatest presentó una elevada reactividad cruzada con los sueros de pacientes con Leishmaniasis, particularmente con la forma difusa (Bioschile 88%, BioKit 87,5%, Pharmatest 42,85% y experimental 100%).

Todas las pruebas evaluadas presentaron

excelentes valores de especificidad con los sueros de pacientes con Malaria, Esquistosomiasis y Toxoplasmosis. Como consecuencia de ello, los valores de especificidad total (calculado con todos los sueros seleccionados del grupo II) se incrementan notablemente respecto a 10 obtenido con pacientes con Leishmaniasis (Tabla II).

Figura 1. Prueba de ELISA experimental, evaluada con 68 sueros de pacientes chagásicos y 26 voluntario sanos.



Asint: Pacientes chagásicos asintomáticos

CDM: Pacientes chagásicos con Miocardiopatía

## DISCUSIÓN

En el presente estudio se pueden destacar algunos aspectos que podrían ser importantes. El primero se refiere a la existencia de falsos negativos. En el 2003 se reportaron casos de falsos negativos, que alcanzaron el 2,1%, en instituciones que utilizaron al menos dos pruebas serológicas. Si tomamos en cuenta los resultados obtenidos en este estudio respecto a los falsos negativos de cada prueba y lo comparamos con el número de sueros positivos empleados (Vp), el porcentaje de falsos negativos varía entre un 4,54% con Pharmatest; 2,1% Bioschile; 1,51% Biokit y 1,09% con la prueba experimental. Como se puede observar la mayoría de los estuches comerciales individualmente presentan niveles de sensibilidad apropiados. Sin embargo, para la evaluación de individuos aparentemente sanos, como los donantes de sangre, los resultados sugieren el empleo de dos pruebas simultáneas, para

minimizar el número de falsos negativos.

Vale la pena destacar que con la excepción de una muestra que resultó falso negativo (Fn) para todos los estuches, el resto de los falsos negativos, se detectaron en muestras diferentes, reforzando la idea que para tener una mayor confiabilidad en las unidades a ser transfundidas, deberían emplearse de rutina dos pruebas diagnósticas diferentes.

Respecto a la sensibilidad, las casas comerciales Biokit y Bioschile presentaron niveles similares, tomando en cuenta que la prueba Bioschile tuvo un falso negativo que no fue incluido en el grupo de sueros empleados para examinar el estuche de Biokit. La prueba de Pharmatest ha mejorado su sensibilidad con un 95,45%, al compararlo con el 85,29%, observado por nosotros (datos no presentados) en el año 1999.

Con los sueros del grupo I, la mayoría de los estuches presentaron individualmente niveles

aceptables de especificidad, pero el empleo de al menos dos pruebas, reduciría sensiblemente el número de falsos positivos, evitando el descarte de unidades de sangre.

Llama la atención que los valores de especificidad obtenidos con los estuches estudiados que emplean antígenos derivados de purificaciones o modificaciones de formas epimastigotes de *T. cruzi*, presenten una mejor especificidad que la observada con Biokit, que emplea cuatro proteínas recombinantes. Esto ilustra que una mejor tecnología no implica necesariamente un mejor desempeño.

En relación a la evaluación con los sueros del grupo TI, los estuches presentaron una buena especificidad, en pacientes con Malaria, Esquistosomiasis y Toxoplasmosis. Los problemas más importantes se presentaron con Leishmaniasis cutánea Americana y visceral. En el primer caso fueron más notables con pacientes con la forma difusa, donde los niveles de anticuerpos se encuentran más elevados<sup>14</sup>. Con la forma visceral, Bioschile, Biokit, y la prueba experimental presentaron los mismos valores de especificidad (89,47 %), mientras que la prueba de Pharmatest alcanzó el 78,94 %. Los perfeccionamientos en especificidad deberán enfocarse con sueros de pacientes con Leishmaniasis, donde el 16 % de las muestras resultaron positivas con todas las pruebas. Estas muestras fueron tomadas en zonas donde ambas enfermedades son endémicas, por lo que no se descarta la posibilidad de infecciones mixtas.

En resumen, este estudio aporta algunos elementos a ser considerados para establecer criterios de selección de pruebas diagnósticas de la enfermedad de Chagas y más que apuntar hacia uno de los estuches en particular, lo que se enfatiza es la necesidad de incorporar una prueba adicional.

El empleo de una prueba experimental

podría ser una alternativa válida. En nuestro país existen diferentes laboratorios que elaboran antígenos para pruebas experimentales, que presentan niveles de sensibilidad iguales o quizás superiores a las pruebas estudiadas. La diferencia con la prueba experimental evaluada en este trabajo radica en el bajo costo del antígeno empleado y su buen desempeño en despistajes realizados en zonas endémicas.

En nuestra opinión la conclusión más importante que se deriva de este trabajo, es la evidente necesidad de un control de calidad de los estuches empleados a nivel nacional, por lo que consideramos necesario efectuar un control aleatorio de la calidad de las pruebas empleadas.

La implementación de una auditoría externa en todos los bancos de sangre y la incorporación de una prueba adicional para incrementar la posibilidad de tener un diagnóstico más certero, serían aspectos importantes a desarrollar, donde la voluntad de cambio por un lado y los costos de las pruebas en el otro, son los elementos claves para darle solución a estas dificultades.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. TDR/ Nature reviews microbiology. (2003) 1: 14.
2. Dias J and Shofield C. The evolution of Chagas' disease control after 90 years since Carlos Chagas' discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94: 103-121.
3. Recomendaciones del grupo de interrupción de la transmisión transfusional. XII Reunión de la comisión Intergubernamental del Cono Sur. <http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/dch-incosur-xii-recomendaciones2.pdf>. Santiago de Chile, 26-28 Marzo 2003.
4. Peralta J, Teixeira M, Shreffler W. et al.

- Serodiagnosis of Chagas disease by enzyme-linked immunosorbent assay using two synthetic peptides as antigens. *J Clin Microbiol.* 1994; 32: 971-4.
5. Gomes M, Galvao L, Macedo A, Pena S and Chiari E. Chagas' disease diagnosis: Comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. *Am Soc Trop Med Hyg* 1999; 60: 205-210.
  6. Umezawa E, Bastos S, Coura J, et al. An improved serodiagnostic test for Chagas' disease employing a mixture of *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. *Transfusion* 2003; 43: 91-7.
  7. Ferreira A, Belem Z, Lemos E, Reed S and Campos-Neto A. Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of Chagas' disease employing a *Trypanosoma cruzi* recombinant antigen that consists of four different peptides. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 4390-4395.
  8. Saez-Alquezar A, Otani M, Sabino E, Salles, N y Chamone D. Programas de control externo de la calidad en serología desarrollados en América Latina con apoyo de la OPS entre 1977 y 2000. *Revista Panamericana de Salud Pública* 2003; 13: 91-102.
  9. WHO Technical Report Series. Control of Chagas' disease. 2002; 905.
  10. Garcia R, Hemández E, Rodríguez-Bonfante C, et al. Primer consenso Venezolano sobre la enfermedad de Chagas: Conclusiones y recomendaciones. *Avances Cardiológicos* 2001; 21:14-23.
  11. Malchiodi EL, Chiaramonte MG, Taranto NI, Zwirner NW, Margni RA. Cross-reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp; use of immunoblotting and ELISA with a purified antigen (AgI63B6). *Clin Exp Immunol* 1994; 97: 417-23.
  12. Chiaramonte MG, Zwirner NW, Caropresi SL, Taranto NI, Malchiodi. *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. human mixed infection. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 54: 271-273.
  13. Frank FM, Fernandez MM, Taranto NJ, Cajal SP, Margni RA, Castro E, Thomaz-Soccol V, Malchiodi EL. Characterization of human infection by *Leishmania* spp. in the Northwest of Argentina: immune response, double infection with *Trypanosoma cruzi* and species of *Leishmania* involved. *Parasitology* 2003; 126:31-39.
  14. Y A Skeiky, D R Benson, J L Costa, R Badaro, and S G Reed. Association of *Leishmania* heat shock protein 83 antigen and immunoglobulin G4 antibody titers in Brazilian patients with diffuse cutaneous Leishmaniasis. *Infect Immunol* 1997; 65: 5368-70.