

ARTICULO ORIGINAL

Inmunodiagnóstico de la infección chagásica por ELISA

Myriam C. López¹, Sofía Duque², Luis C. Orozco³, Diana Camargo⁴, Luis E. Gualdrón²,
Elvia Cáceres¹, Margarita Ronderos⁵, Maritza Rey⁵, Augusto Corredor¹

Resumen

La demostración del agente infeccioso es la regla de oro en las parasitosis, pero, esto no siempre es factible. Por ello, en la infección chagásica se recurre a la detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* siendo las pruebas serodiagnósticas de gran utilidad. El presente estudio estandarizó y evaluó la prueba inmunoenzimática Elisa para el inmunodiagnóstico de la infección chagásica. Se confrontaron 595 muestras de suero de pacientes provenientes de Guateque, Boyacá, zona endémica de la enfermedad de Chagas, con epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa colombiana IRHO/CO/69/Guateque utilizando las pruebas inmunodiagnósticas de inmunofluorescencia indirecta (IFI), prueba de referencia, y el ensayo inmunoenzimático ELISA. El análisis de la validez de ésta se realizó mediante el cálculo del área bajo la curva del operador receptor (ROC) como medida de la exactitud (validez). Las condiciones óptimas de la prueba ELISA fueron: antígeno 0,75 µg/ml y dilución de la muestra 1:1.000. El ensayo del estudio según los puntos de corte 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 ofrece una sensibilidad de 0,99, 0,99, 0,98 y 0,93 y una especificidad de 0,94, 0,96, 0,98 y 0,98, respectivamente. El ELISA del estudio se muestra como una prueba válida no sólo por la sensibilidad y especificidad sino porque el análisis del área bajo la curva ROC fue de 0,9952 que es muy cercano al ideal. La prueba de ELISA es superior a la de IFI para la detección de anticuerpos contra *T. cruzi* y podría ser utilizada en estudios seroepidemiológicos en zonas de alta y moderada prevalencia.

Palabras clave: Chagas, *T. cruzi*, suero, ELISA.

Immunodiagnosis of Chagas' disease by ELISA

Abstract

Demonstration of the infectious agent is the gold standard in parasitic infections but this is not always feasible. Thus diagnosis is confirmed through *Trypanosoma cruzi* antibody detection (in the case of Chagas' disease) by using serological assays. In this study the enzyme immunoassay (ELISA) for the diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection was standardised and assessed. 595 serum samples taken from people coming from the endemic area of Guateque, Boyaca, were tested against *T. cruzi* epimastigotes from the

¹ Laboratorio de Parasitología, Instituto Nacional de Salud y Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá, D.C., Colombia

² Laboratorio de Parasitología, Instituto Nacional de Salud, Santafé de Bogotá, D.C., Colombia

³ Escuela de Enfermería, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Santander.

⁴ Escuela de Fisioterapia, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Santander.

⁵ División de Epidemiología, Ministerio de Salud Pública, Colombia, Santafé de Bogotá, D.C., Colombia

IRHO/CO/69/Guateque Colombian strain, using both the immunofluorescent antibody test (IFAT) and the ELISA test. Analysis of the ELISA test's validity was done through estimation of the area under the receptor-operator curve (ROC). The optimum conditions for the ELISA test were an antigen concentration of 0.75 μ gr/ml and sample dilution of 1:1000. The assay's sensitivity for cut-off points of 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 was 0.99, 0.99, 0.98 and 0.93 and its specificity for the same cut-off points was 0.94, 0.96, 0.98 and 0.98. The ELISA test is a valid and useful test, not only because of its sensitivity and specificity but also because the estimation of the area under the receptor-operator curve (ROC) was 0.9952, this being very close to the ideal. The ELISA test is better than the IFAT test for detection of *Trypanosoma cruzi* infection antibodies and could be used in seroepidemiological surveys in areas of moderate to high prevalence.

Key words: Chagas, *T. cruzi*, serum, ELISA

Introducción

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana reviste un problema de salud pública en todo el continente americano, extendiéndose desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina. En Colombia, hay transmisión intradomiciliaria por debajo de los 2000 msnm a lo largo de la cordillera oriental, el Magdalena medio, La Guajira, los Llanos Orientales y las zonas selváticas del oriente colombiano (1). La enfermedad presenta formas agudas, crónicas e inaparentes. El diagnóstico parasitológico de la infección se realiza identificando el parásito, *Trypanosoma cruzi* o detectándolo mediante pruebas de biología molecular como PCR (2) y sondas de ADN (3) en las tres fases de la enfermedad.

Aunque la detección del parásito es la regla de oro, su identificación no siempre es viable; por tanto, se recurre a la detección de anticuerpos contra el parásito mediante pruebas inmunológicas como la fijación de complemento (FC) (4), la hemaglutinación indirecta (HAI) (5), la inmunofluorescencia indirecta (IFI) (6) y el ensayo inmunoenzimático (ELISA) (7).

El presente trabajo establece la prueba ELISA como método inmunodiagnóstico de la infección chagásica, utilizando una cepa colombiana de *T. cruzi*, como antígeno, y la IFI como prueba de referencia.

Materiales y métodos

Muestras. Se tomaron al azar 595 muestras de sangre de personas de ambos géneros y de todas

las edades, de la zona urbana y rural de la población de Guateque (Boyacá), de las que se obtuvieron sueros que fueron divididos en alícuotas y almacenados a -20° C. La región de Guateque fue seleccionada por ser una zona endémica de la enfermedad de Chagas (8).

Inmunofluorescencia indirecta. Se detectaron anticuerpos contra *T. cruzi* en las muestras de suero mediante IFI desarrollada por M.E. Camargo (6). Esta sirvió como prueba de referencia, considerándose valores positivos los mayores o iguales a 1:32.

Ensayo inmunoenzimático (ELISA)

Obtención de antígeno

Parásitos. Se utilizaron epimastigotas de *T. cruzi* de la cepa colombiana IRHO/CO/69/Guateque, mantenida en cultivo en el Laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Salud.

Preparación del antígeno. El antígeno soluble se preparó de acuerdo con la metodología descrita por Pappas y col. (9) y Corredor y col. (10).

Conjugado enzimático. Se usó anti-IgG humana conjugada con fosfatasa alcalina, preparada en el Laboratorio de Inmunología del Instituto Nacional de Salud.

Prueba de ELISA. Se realizó de acuerdo con las normas establecidas por Voller y col. (7), utilizando microplacas de poliestireno Dynatech M-129-A y un fotolorímetro Uniskan I para la lectura. El antígeno se adicionó en concentraciones de un rango de 125-900 ng/ml. Las diferentes diluciones de éste se disolvieron en una solución reguladora

de carbonato-bicarbonato de sodio 0,1M, pH 9,6; se incubaron durante tres horas a temperatura ambiente en microplacas en volúmenes de 100 μ l por pozo. Después de lavar tres veces con solución salina reguladora de fosfatos (PBS) 0,15M, pH 7,4, con tween 20 al 0,05%, se agregaron 100 μ l de suero en diluciones de 1:400 a 1:1.600 y se incubaron durante tres horas a temperatura ambiente. Se lavó nuevamente y se agregaron 100 μ l de conjugado enzimático, titulado previamente con un suero reactivo y uno no reactivo en diluciones de 1:5.000 a 1:35.000, el cual se incubó 18 horas a 4 °C. Se repitió el proceso de lavado como se describió anteriormente y, luego, se agregaron 100 μ l de para-nitro-fenil-fosfato en una concentración de 1 mg/ml en solución reguladora de dietanolamina al 10%, pH 9,8. Se incubó treinta minutos y, finalmente, se agregaron 25 μ l de NaOH 3N. Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm.

Análisis. Se obtuvo la distribución de frecuencia de las absorbancias para los sueros positivos y negativos definidos por IFI.

Se levantó una gráfica y se calculó el área bajo la curva del operador receptor (ROC), como una medida de la exactitud (validez) de la prueba. Para el cálculo del área bajo la curva, se utilizó la técnica de la regla trapezoidal (11).

Con base en la distribución de frecuencias, se analizaron varios puntos de corte para obtener la sensibilidad (S) y la especificidad (E) de ELISA, haciendo la corrección de las misma (12) con base en el promedio de sensibilidad y especificidad publicadas para IFI en tres trabajos clásicos (13-15).

Resultados

Estandarización del ELISA: las condiciones para el inmunodiagnóstico de la infección chagásica por ELISA fueron: concentración óptima de antígeno soluble de *T. cruzi* 0,75 μ g/mL; dilución óptima de suero y de conjugado 1:1.000 y 1:10.000, respectivamente. Los valores anteriormente mencionados se escogieron debido a que en ellos se observó una mayor diferenciación entre las muestras positivas y negativas.

Evaluación del ELISA. La figura 1 muestra la distribución de frecuencias del ELISA, para las muestras positivas y negativas en la IFI, donde se observa una distribución bimodal con una intersección de las dos curvas entre las absorbancias de 0,3 y 0,4.

La curva ROC se observa en la figura 2, el área bajo la curva es de 0,9952, muy cercana al ideal de 1.

Las sensibilidades (S) y especificidades (E) de la IFI obtenidas en los tres trabajos mencionados (12-14) son 1,0, 0,9428, 0,9167 y 0,9444, 1,0, 0,9878, respectivamente. Con estos datos, se obtuvo un promedio para la sensibilidad de 0,9532 y para la especificidad de 0,9774. Con base en estos datos, se corrigieron la sensibilidad y

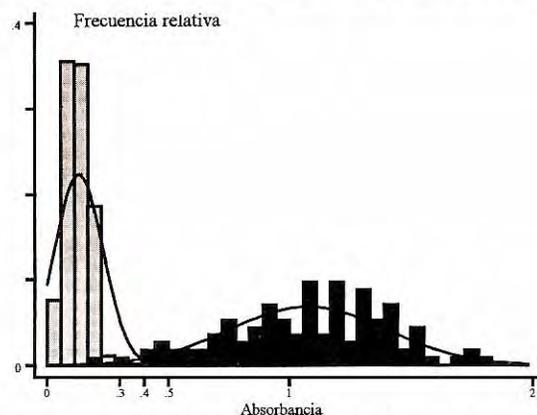


Figura 1. Distribución de las frecuencias de las absorbancias de ELISA para las muestras positivas y negativas.

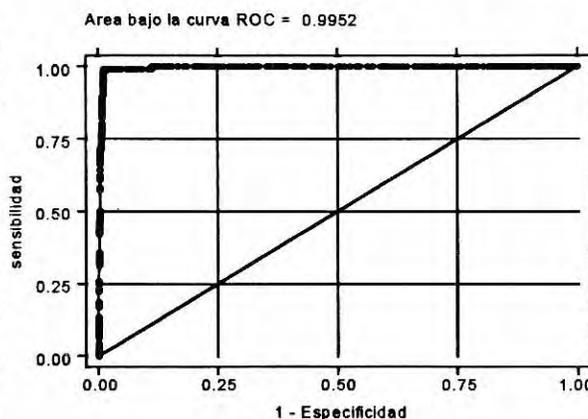


Figura 2. Área bajo la curva del receptor operador (ROC) de la prueba de ELISA.

especificidad observadas para cuatro puntos de corte del ELISA: 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 de absorbancia. Los datos se muestran en los cuadros 1 y 2. Es aparente en el cuadro 2 que, a excepción de la (E) para los puntos de 0,2 y 0,3 de absorbancia, todos los demás datos corregidos son mayores que 1, un imposible en estudios de probabilidades.

Cuadro 1. Distribución de las absorbancias de los sueros positivos y negativos en ELISA según diferentes puntos de corte.

		ELISA (Abs.) Puntos de corte							
		≥0,2	<0,2	≥0,3	<0,3	≥0,4	<0,4	≥0,5	<0,5
IF +		111	1	111	1	110	2	105	7
IF		29	454	8	475	5	478	5	478

Cuadro 2. Valores de sensibilidad y especificidad aparentes y corregidas en varios puntos de corte del ELISA.

Abs	Sensibilidad aparente	Sensibilidad corregida	Especificidad aparente	Especificidad Corregida
0,2	0,9911	1,0942	0,9400	0,9507
0,3	0,9911	1,0992	0,9635	0,9743
0,4	0,9821	1,0898	0,9896	1,0008
0,5	0,9375	1,0402	0,9896	1,0003

Discusión

Uno de los errores más frecuentes al evaluar una prueba diagnóstica es la utilización de muestras seudoretrospectivas y asumir los datos obtenidos para (S) y (E) como válidos (16). Este tipo de muestreo sólo es válido para la fase inicial de estandarización de la prueba (17, 18).

De los tres artículos sobre IFI (13-15), solamente el de Camargo y col. (14) no parece ser un muestreo seudoretrospectivo, a pesar de lo cual sus datos para S y E son bastante parecidos al de los otros dos trabajos y están muy cercanos al ideal para una prueba diagnóstica. El hecho de que al utilizar estos datos, para corregir las S y las E observadas del Elisa, los valores corregidos sean mayores de 1 hace sospechar que los valores de S y E para IFI han sido, en realidad, sobreestimados.

En el presente trabajo, la muestra es una clásica de corte transversal, con base de población y con prevalencia moderadamente alta, alrededor de 19% (16).

El ELISA en el presente trabajo se muestra como una prueba válida no sólo por la S y E encontradas sino porque en el análisis del área bajo la curva ROC el dato obtenido de 0,9952 está muy cercano al ideal.

De 18 trabajos publicados entre 1975 y 1994, sobre ELISA en enfermedad Chagas, sólo 4 no fueron realizados con muestras seudoretrospectivas y utilizaron un muestreo de corte transversal y a la IFI como prueba de referencia y, además, presentan datos de manera que las S y las E se pueden calcular (19-22).

Las S y E observadas, sin corrección por la S y la E de la IFI, para los cuatro trabajos se observan en el cuadro 3. Al comparar estos datos con los del presente trabajo, no se aprecian grandes diferencias excepto en la S del trabajo de Zicker y col. (21) que es muy baja.

Esto hace pensar que el ELISA es una prueba superior al IFI, en zonas de alta y moderada prevalencia como lo es la zona de Guateque. El Departamento de Boyacá es considerado como una de las regiones de Colombia de mayor endemidad para la enfermedad de Chagas, especialmente la zona que comprende el valle de Tenza donde se localiza el municipio de Guateque. Allí existen condiciones para que se presente la enfermedad de Chagas: ecología favorable, reservorios de *T. cruzi*, vectores infectados peridomiciliarios y viviendas propicias para la colonización del vector (23).

Cuadro 3. Valores de sensibilidad y especificidad aparentes obtenidos de cuatro estudios de validación de la prueba de ELISA en que no se utilizó muestreo seudoretrospectivo.

Autor (ref.)	N	Prevalencia	Sensibilidad aparente	Especificidad aparente
Voller (3)	124	0,528	0,9846	0,9828
Figueredo (12)	265	0,104	0,9774	0,9868
Zicker (13)	6222	0,098	0,8322	0,9667
Spencer (14)	302	0,297	0,9213	0,9671

Esta prueba, dada su reproducibilidad, objetividad en la lectura y facilidad de manejo con una gran cantidad de muestras, podría ser utilizada en estudios seroepidemiológicos de la infección por *T. cruzi*.

Agradecimientos

El presente trabajo se realizó con la coautorización del personal científico y administrativo del Hospital de San Rafael, Guateque, Boyacá.

Referencias

1. **Botero D, Restrepo M.** Parasitosis humanas. 3a ed. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas; 1998.
2. **Jones EM, Colley DG, Tostes S, Lopes ER, Vnencak-Jones CL, McCurley TL.** Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg* 1996;48:348-57.
3. **Wagner W, So M.** Genomic variation of *Trypanosoma cruzi*: involvement of multicopy genes. *Infect Immun* 1990;58:3217-24.
4. **Almeida JQ.** Isofixation curves as a method of standardizing quantitative complement fixation test. *J Immunol* 1956;76:259-63.
5. **Camargo ME, Hoshino S, Siqueira GRV.** Hemagglutination with preserved, sensitized cells: a practical test for routine serologic diagnosis of American trypanosomiasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1973;15:81-5.
6. **Camargo ME.** Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1966;8:227-34.
7. **Voller A, Bartlett A, Bidwell DE.** Enzyme immunoassays for parasitic diseases. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 1976;70:98-106.
8. **Corredor A, Santacruz M, Páez S, Guatame LA.** Distribución de los triatomíneos domiciliarios en Colombia. Bogotá, D.E.: Instituto Nacional de Salud; 1990.
9. **Pappas MG, McGreevy PB, Hajkowski R, Hendricks LD, Oster ChN, Hockmeyer WT.** Evaluation of promastigote and amastigote antigens in the indirect fluorescent antibody test for american cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1983;32:1060-7.
10. **Corredor A, López MC, Duque S, Gualdrón LE, Tesh RB.** Estandarización y evaluación del ELISA para el serodiagnóstico de leishmaniasis. I. Leishmaniasis cutánea. *Biomédica* 1995;15:83-8.
11. **Beck JR, Shultz EK.** The use of ROC curves in test performance evaluation. *Arch Pathol Lab Med* 1986;110:13-20.
12. **Staquet M, Rozencweig M, Lee YJ, Muggia FM.** Methodology for the assesment of new dichotomus diagnostic tests. *J Chron Dis* 1981;34:599-610.
13. **Fife EH, Muschel LH.** Fluorescent-antibody technic for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *Proc Soc Exp Biol Med* 1959;101:540-3.
14. **Camargo ME, Hoshino-Shimazu S, Macedo V, Peres BA, Castro C.** Diagnóstico sorológico da infecção humana pelo *Trypanosoma cruzi* estudo comparativo de testes de fixação do complemento, imunofluorescencia, hemaglutinação e floculação em 3.624 soros. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1977;19:254-60.
15. **Sadun EH, Duxbury RE, Williams JS, Anderson RI.** Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of African and American trypanosomiasis in man. *J Parasitol* 1963;49:385-8.
16. **Orozco-Vargas LC, Camargo D.** Evaluación de técnicas diagnósticas y tipos de muestreos. *Biomédica* 1997;17:321-4.
17. **Nierenberg AA, Feinstein AR.** How to evaluate a diagnostic marker test. Lessons from the rise and fall of dexamethasone suppression test. *JAMA* 1988;259:1699-1702.
18. **Orozco LC, Ovalle CE, Duque S, López MC, Nicholls RS.** Exactitud del ELISA para el diagnóstico de fasciolosis bovina: análisis del área bajo la curva del receptor operador (ROC). *Biomédica* 1996;16:122-31.
19. **Voller A, Draper C, Bidwell DE, Bartlett A.** Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas disease. *Lancet* 1975;y:426-7.
20. **Figueredo-Silva J, Kaneda Y, Tachibana H, Furushima R, Tateno S, Correia-Limas FG, Bento DN.** Epidemiological survey of the *Trypanosoma cruzi* infection in north-eastern Brasil using different diagnostic methods. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1991;33:193-8.
21. **Zicker F, Smith PG, Luquetti AO, Oliveira OS.** Mass screening for *Trypanosoma cruzi* infections using the immunofluorescence, ELISA and hemagglutination tests on serum samples and blood eluates from filter-paper. *Bull WHO* 1990;68:465-71.
22. **Spencer HC, Allain DS, Sulzer AJ, Collins WE.** Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* 1980;29:179-82.
23. **Morales A, Corredor A, Osorno E, Parra J.** Infección natural de *Mus musculus* con *Trypanosoma cruzi* en una región de Colombia. *Rev Acad Colomb Ciencias Exatas, Físicas y Naturales* 1969;13:375-7.