

NOTA TÉCNICA

## Comparación de la prueba de inmunofluorescencia indirecta, un inmunoensayo enzimático y la prueba comercial Chagatek® para la detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi*

Clara Enciso <sup>1</sup>, Marleny Montilla <sup>2</sup>, María M. Santacruz <sup>2</sup>, Rubén Santiago Nicholls <sup>2,4</sup>,  
Adriana Rodríguez <sup>3</sup>, Marcela Mercado <sup>1</sup>, Concepción Puerta <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia.

<sup>2</sup> Laboratorio de Parasitología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia.

<sup>3</sup> Centro de Investigaciones Odontológicas, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia.

<sup>4</sup> Unidad de Parasitología, Departamento de Salud Pública y Tropical, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia.

La enfermedad de Chagas constituye un problema de salud pública, particularmente en la región oriental de Colombia. Debido a la migración de la población de las áreas rurales hacia los centros urbanos, la transmisión transfusional se torna cada vez mayor. Sin embargo, esto puede prevenirse mediante pruebas serológicas de tamizaje adecuadas. Puesto que los bancos de sangre nacionales utilizan pruebas comerciales extranjeras, se decidió comparar, en un estudio preliminar, las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ensayo inmunoenzimático (ELISA) que utilizan cepas colombianas como antígeno, con la prueba comercial Chagatek®. Los sueros de los donantes se clasificaron en dos grupos, de acuerdo con el resultado de la prueba de IFI, así: grupo I, 15 pacientes positivos, y grupo II, 14 pacientes negativos. A los sueros de ambos grupos se les realizó tanto la prueba de ELISA como la prueba Chagatek®; se encontró que la prueba de ELISA detectó como positivos el 100% de los pacientes del grupo I y el 7 % (1/14) del grupo II. Por su parte, la prueba de Chagatek® detectó como positivos el 93% (14/15) de los pacientes del grupo I y el 50% (7/14) del grupo II. Adicionalmente, se encontró que el índice kappa de concordancia entre la prueba de ELISA y el IFI fue de 0,93 (IC95%: 0,8-1), mientras que para las pruebas de IFI y Chagatek® fue de 0,43 (IC95%: 0,26-0,62) y para las pruebas de ELISA y Chagatek® de 0,49 (IC95%: 0,31-0,67). Dados estos resultados, se recomienda evaluar el uso de una prueba de tamizaje nacional que utilice antígenos colombianos.

**Palabras clave:** enfermedad de Chagas, ELISA, Chagatek®, IFI, índice kappa, *Trypanosoma cruzi*.

### **Comparison of the immunofluorescent antibody (IFAT) and ELISA tests and the commercial Chagatek® test for detection of anti-*Trypanosoma cruzi* antibody**

Chagas disease is a public health problem in Colombia, particularly in the eastern region. Because of human migration from rural areas to urban centers, the possibility of transfusional transmission becomes increasingly important. However the risk can be minimized by a careful screening of blood donors by means of serological tests. Colombian blood banks use commercial, foreign serological tests for screening for *T. cruzi* infection. The purpose of the current study was to compare the IFAT and ELISA tests (both use antigen obtained from Colombian strains) with the commercially available Chagatek® tests. Sera of blood donors were classified in two groups on the basis of the IFAT: group I, 15 positive patients and group II, 14 negative patients. Sera from each group were tested by the ELISA and Chagatek® tests.

The ELISA test detected 100% of the patients as positive in group I and 7% (1/14) of patients as positive in group II. The Chagatek® test detected 93% (14/15) of the patients as positive in group I and 50% (7/14) in group II. The kappa index for concordance between the ELISA and IFAT tests was 0.93 (95% C.I.: 0.80-1.00); between IFAT and Chagatek® 0.43 (95% C.I.: 0.26-0.62), and between ELISA and Chagatek® 0.49 (95% C.I.: 0.31-0.67). These results highlighted

the importance of using autochthonous Colombian strains as antigens in screening tests for blood donors.

**Key words:** Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, IFAT, ELISA, Chagatek®, kappa index.

La enfermedad de Chagas, causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, constituye un problema de salud pública en quince países de Latinoamérica, donde 18 millones de personas se encuentran afectadas y se presentan 200.000 nuevos casos por año (1). La enfermedad posee un amplio espectro clínico que varía desde una forma indeterminada, en la cual no hay manifestaciones clínicas, hasta el desarrollo de megasíndromes intestinales y cardiopatía crónica que puede conducir a la muerte súbita del paciente (2).

Durante la fase indeterminada, los pacientes son inconscientes de su infección y se constituyen en un reservorio importante de ella que contribuye a mantener el ciclo del parásito (1).

Aunque la enfermedad de Chagas es una entidad rural asociada con condiciones de pobreza, las áreas urbanas se han visto implicadas debido a la migración y al desplazamiento de campesinos infectados provenientes de áreas endémicas y la transfusión es la principal vía de transmisión en estas circunstancias (3).

El Ministerio de Salud de Colombia expidió en mayo de 1995 la Resolución No. 001738 por medio de la cual se estableció la obligatoriedad de la realización de tamizaje para infección por *T. cruzi* a todas las unidades de sangre. A partir de esa fecha, la cobertura del tamizaje por infección de *T. cruzi* en los bancos de sangre aumentó de 47,98% en 1995 a 99,8% en 2001, con un porcentaje global de seropositividad de 0,5%. En este mismo año se tamizaron 422.101 unidades y la prevalencia global de infección en donantes fue de 0,91% (2.412 unidades positivas); los departamentos con mayores prevalencias de infección fueron: Casanare (7,08%), Guaviare

(5,03%), Norte de Santander (2,57%), Santander (1,57%), Caquetá (1,55%), Chocó (1,38%), Meta (1,33%) y Arauca (1,23%) (4).

Existen varias pruebas diagnósticas comerciales aprobadas por el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (Invima) para su uso como pruebas de tamizaje en bancos de sangre. Llamativamente, todas ellas emplean como antígeno preparaciones obtenidas a partir de cepas extranjeras del parásito; tal es el caso de la prueba Chagatek® (Organon, Técnica).

Teniendo en cuenta que Bucio *et al.* (5) informaron que el uso de cepas autóctonas aumenta la sensibilidad y la especificidad de la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* en una población mexicana, en este trabajo se compararon los resultados de reactividad anti-*T. cruzi* de donantes colombianos obtenidos con las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ELISA que emplean como antígeno cepas colombianas del parásito, con la prueba ELISA comercial Chagatek®.

## Materiales y métodos

### Muestras de suero

Se trabajó con sueros de 29 donantes de la Cruz Roja Colombiana. Los donantes se clasificaron en dos grupos según el resultado de la prueba de IFI (Laboratorio de Parasitología, INS), que se tomó como prueba de referencia: grupo I, 15 pacientes positivos y grupo II, 14 pacientes negativos. Adicionalmente, 20 sueros obtenidos de individuos sanos de aproximadamente 20 años de edad, que no habían vivido en zonas endémicas de la enfermedad, se utilizaron para obtener el punto de corte de la prueba de ELISA. El Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana aprobó este estudio.

### Parásitos

Para la prueba de ELISA se trabajó con 3 cepas de *T. cruzi* aisladas de hospederos y regiones geográficas colombianas diferentes (cuadro 1).

### Correspondencia:

Concepción Puerta, Carrera 7 No.43-82, Bogotá, D.C., Colombia.

Teléfono: (+571) 320 8320, extensión 4024; fax: (571) 320-8320, extensión 4021  
cpuerta@javeriana.edu.co

Recibido: 22/07/03; aceptado: 30/01/04

Para la prueba de IFI se utilizó la cepa colombiana MHOM/CO/92/FCh de origen silvestre, aislada de un paciente de Norte de Santander en fase aguda de la enfermedad (cuadro 1) (6). Los parásitos se cultivaron en medio REI modificado, suplementado con 2% SFB (suero fetal bovino) a 24°C y gentamicina 100 mg/ml. Una vez obtenido el cultivo en masa, los parásitos se lisaron siguiendo la metodología informada por Santana *et al.* (7).

#### ELISA

Se siguió la técnica descrita por Arciniegas *et al.* (8). En cada microplaca se montaron un control positivo alto, un control positivo bajo (cerca al punto de corte) y un control negativo. El punto de corte de la prueba se estableció como la media del valor de los sueros controles normales (20 sueros de personas sanas no infectadas) más 2 desviaciones estándar. La positividad o negatividad de las muestras frente al antígeno se determinó con la siguiente fórmula:

Índice de reactividad =  $\frac{\text{absorbancia de la muestra}}{\text{absorbancia del control positivo bajo}}$

Si el índice de reactividad de la muestra es mayor o igual a 1, la muestra se considera positiva; en caso contrario, negativa. La zona gris o dudosa de la prueba se estableció entre los valores de índice de reactividad de 0,9 a 0,99.

#### Inmunofluorescencia indirecta

Esta prueba se realizó según lo descrito por Camargo *et al.* (9) y se analizó cada suero por triplicado. Se consideraron positivos aquellos sueros cuyos títulos fueron iguales o mayores de 1:32.

#### Chagatek®

Esta prueba se realizó en la Cruz Roja de Colombia, siguiendo estrictamente el protocolo descrito por la casa fabricante (Organon, Teknica).

#### Análisis estadístico

La concordancia entre las diferentes pruebas se determinó mediante el índice kappa, que varía entre -1 y +1, en donde cero representa los acuerdos esperados por el azar, -1 desacuerdo perfecto y 1 acuerdo perfecto (10).

Se determinaron también los intervalos de confianza del 95% para los valores de concordancia.

#### Resultados

La prueba de ELISA desarrollada en este trabajo detectó como positivos el 100% de las muestras del grupo I y 1/14 (7%) de las muestras del grupo II. Por su parte, la prueba de Chagatek® detectó como positivos 14/15 (93%) de las muestras del grupo I y 7/14 (50%) del grupo II.

Así mismo, cuando se compara la prueba de ELISA con la prueba Chagatek®, se observa que el ELISA detectó como positivas 15 de las 21 muestras positivas por Chagatek® y 1 de las 8 muestras negativas por Chagatek®.

Adicionalmente, se encontró que el índice kappa de concordancia entre la prueba de ELISA y el IFI fue de 0,93 (IC95%: 0,8-1), mientras que para las pruebas de IFI y Chagatek® fue de 0,43 (IC95%: 0,26-0,62) y para las pruebas de ELISA y Chagatek® fue de 0,49 (IC95%: 0,31-0,67).

**Cuadro 1.** Características de las cepas de *Trypanosoma cruzi* utilizadas en la preparación de antígeno para las pruebas de ELISA e IFI.

Código	Huésped	Origen geográfico	Ciclo de transmisión
IRHO/CO/98/Munantá*	<i>Rhodnius prolixus</i>	Boyacá	Doméstico
MHOM/CO/87/S.P.R.*	Humano	Casanare	Doméstico
MDID/CO/87/No.3*	<i>Didelphis marsupialis</i>	Norte de Santander	Selvático
MHOM/CO/92/FCh**	Humano	Norte de Santander	Selvático

\*: Utilizada en ELISA

\*\* : Utilizada en IFI

## Discusión

En este estudio se comparó la capacidad de detección de anticuerpos anti-*T.cruzi* de la prueba comercial Chagatek® con un ensayo inmunoenzimático (ELISA) que utiliza cepas colombianas del parásito como antígeno. Como patrón de oro se usó la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) desarrollada por el Instituto Nacional de Salud (INS), Bogotá, Colombia, la cual tiene un excelente comportamiento en los paneles de Evaluación Externa de Desempeño (EED), remitidos al INS por el Hemocentro de Sao Paulo, Brasil. Se observaron notorias discrepancias entre los resultados obtenidos con las pruebas de ELISA e IFI y los arrojados por la prueba Chagatek®.

Llama la atención el alto número de muestras con resultado falso positivo en Chagatek® (7/14; 50%), lo cual sugiere que en los bancos de sangre en que se utiliza esta prueba se podría estar descartando, sin la debida justificación, la mitad de las unidades de sangre tamizadas. Si todas las unidades de sangre que se obtienen anualmente en el país fueran tamizadas con esta prueba, ello podría representar un desperdicio anual injustificado de 185.000 a 218.000 unidades de sangre.

Esto tendría serias implicaciones tanto desde el punto de vista económico por el alto costo de obtener unidades de sangre y por el gran número de las cuales serían posteriormente descartadas, como desde el punto de vista de la atención médica, puesto que la disponibilidad de unidades de sangre para transfundir se vería seriamente restringida.

Así mismo, se observó que el porcentaje de muestras con resultados falsos negativos fue del 6,6% (1/15), lo cual sugiere que de cada 100 unidades positivas que se tamizan con la prueba Chagatek®, seis a siete dan resultado negativo con el consecuente riesgo de transmisión transfusional.

Llamativamente, el programa de control de calidad en serología de la enfermedad de Chagas en Latinoamérica con el apoyo de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), 1997-2000, encontró para el total de las distintas pruebas empleadas en los diferentes bancos de sangre,

entre ellas Chagatek®, un 2,1% de resultados falsos negativos en 520 muestras y un 0,4% de resultados falsos positivos en 2.288 muestras (11).

Por otra parte, entre las posibles causas de las discordancias observadas, es necesario considerar las siguientes:

1. La procedencia geográfica de las cepas: mientras Chagatek® utiliza cepas argentinas, en las pruebas de IFI y ELISA se utilizaron cepas colombianas caracterizadas por el desarrollo de afecciones cardíacas y menor virulencia. En contraste, las cepas del Cono Sur se caracterizan por desarrollar megasíndromes intestinales y presentar mayor virulencia (12,13). Es muy probable que existan diferencias importantes en la composición antigénica de las cepas.
2. Número, ciclo de transmisión y huésped de origen de las cepas usadas como antígeno: en la ELISA se usaron tres cepas que difieren en su ciclo, hospedero y región geográfica de procedencia. Aun cuando en Chagatek® no es posible conocer las características de las cepas empleadas como número, grupo, zimodema, procedencia y estadio de desarrollo, difícilmente se podría pensar en un número idéntico de cepas de iguales características.
3. Estadio del parásito utilizado como antígeno: tanto en la ELISA como en la IFI se utilizaron formas epimastigotas procedentes de cultivo *in vitro*. Es bien conocido cómo el parásito exhibe antígenos estadio-específicos, muchos de los cuales han sido reconocidos como participantes en los mecanismos de infección y en la respuesta del sistema inmune ante ella (14).
4. Preparación del antígeno: los estudios realizados por Mendes *et al.* (15) indican cómo el proceso de obtención de extractos solubles del parásito, así como las condiciones de centrifugación, afectan profundamente el perfil de antígenos o epítomos reconocidos por los sueros.
5. Reactividad cruzada: es bien conocido que las pruebas de tamizaje del banco de sangre aun

cuando tienen un 100% de sensibilidad, su porcentaje de especificidad es mucho menor que el de las pruebas confirmatorias como la IFI, debido principalmente a reacciones cruzadas con otros tripanosomátidos como *Leishmania* y *Trypanosoma rangeli* (16).

Por otra parte, la elevada concordancia entre la prueba de ELISA desarrollada y la prueba de IFI puede deberse al uso en ambos casos de formas epimastigotas de cepas colombianas del parásito como antígeno.

Aun cuando este trabajo es un ensayo preliminar que requiere ser confirmado con un mayor número de muestras, se sugiere evaluar el uso de una prueba de tamizaje nacional que utilice antígenos obtenidos a partir de cepas colombianas de *T. cruzi*.

### Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento a la Cruz Roja Colombiana, en especial a José Marun Chagin y José Joaquín Cantor por su valiosa colaboración.

### Referencias

1. **World Health Organization.** Control of Chagas disease. Second Report of the WHO Expert Committee. World Health Organization, Technical Report Series 905. Geneva: WHO; 2002. p.1-119.
2. **Tanowitz H, Kirchhoff L, Simon D, Morris S, Weiss, L, Wittner M.** Chagas' disease. Clin Microbiol Rev 1992; 5:400-19.
3. **Guhl F, García M, Juliao O, Pachón D, Molina S, Barrios D.** Enfermedad de Chagas transfusional en Colombia. Tribuna Médica 1995;91:129-36.
4. **Behrend M, Beltrán M, Restrepo M, Kroeger A.** Control de la enfermedad de Chagas en bancos de sangre en Colombia. Biomédica 2002;22:39-45.
5. **Bucio M, Cabrera M, Segura E, Zenteno E, Salazar-Schettino M.** Identification of immunodominant antigens in Mexican strains of *Trypanosoma cruzi*. Immunol Invest 1999;28:257-68.
6. **Rodríguez P, Montilla M, Nicholls RS, Zarante I, Puerta C.** Isoenzymatic characterization of Colombian strains of *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz 1998;93:739-40.
7. **Santana L, Montilla M, Nicholls RS, Puerta C.** Variación antigénica de la cepa Munantá de *Trypanosoma cruzi* después de pase por ratón. Biomédica 1998; 18:134-40.
8. **Arciniegas D, Ortegón L, Rodríguez A, Mercado M, Rosas F, Velasco V, et al.** Determinación de la presencia de anticuerpos contra colágeno tipo I y IV en pacientes chagásicos. Acta Médica Colomb 2000;25: 117-21.
9. **Camargo ME.** Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1966;8:227-34.
10. **Landis JR, Koch GG.** The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics 1977;33: 159-79.
11. **Saez-Alquezar A, Otani MM, Sabino EC, Salles NA, Chamone DF.** Programas de control externo de la calidad en serología desarrollados en América Latina con el apoyo de la OPS entre 1997 y 2000. Rev Panam Salud Púb 2003;13:91-102.
12. **Calderón O.** *Trypanosoma cruzi*: un parásito del cual queda mucho por conocer. Revista del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica 2001;8:1-5.
13. **Miles MA, Feliciangeli MD, Rojas de Arias A.** American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. BMJ General Medical Journal Website 2003; 326:1444-8.
14. **Brener Z, Krettli U.** Immunology of Chagas' disease. En: Wiley DJ, editor. Modern parasite, biology, cellular, immunological and molecular Aspects. New York: WH Freeman & Co; 1990. p.247-61.
15. **Mendes R, Hoshino S, Moura, S, Mota I, Heredia R, Luquetti A, et al.** Serological diagnosis of Chagas' disease: a potential confirmatory assay using preserved protein antigens of *Trypanosoma cruzi*. J Clin Microbiol 1997;35:1829-34.
16. **Winkler MA, Brashear RJ, Hall HJ, Schur JD, Pan AA.** Detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* among blood donors in the southwestern and western United States. II. Evaluation of supplemental enzyme immunoassay and radioimmunoprecipitation assay for confirmation of seroreactivity. Transfusion 1995;35: 219-25.