

# Diagnóstico de la enfermedad de Chagas en la población procedente de zona endémica en Barcelona. Valoración de las pruebas de diagnóstico utilizadas

Paulo López-Chejade, Roser Fisa, Montserrat Gállego, L. Iniesta, Cristina Riera, Montserrat Portús, RIVEMTI

Laboratorio de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universitat de Barcelona  
RIVEMTI, Recerca i Vigilància Epidemiològica en Malalties Tropicals i Salut Internacional

## Correspondencia:

Montserrat Portús

Laboratorio de Parasitología. Facultad de Farmacia. Universitat de Barcelona

E-mail: mportus@ub.edu

## Resumen

Se aportan los resultados obtenidos en el cribado serológico, diagnóstico y análisis de la transmisión congénita de la enfermedad de Chagas en inmigrantes procedentes de América Central y del Sur residentes en Barcelona, mediante la aplicación de técnicas parasitológicas (examen directo y cultivo), serológicas (ELISA con antígeno recombinante, ELISA convencional, inmunofluorescencia indirecta, *Western blot*) y moleculares (PCR).

**Palabras clave:** Enfermedad de Chagas. Diagnóstico serológico. PCR.

## Summary

The serological screening, diagnosis and analysis of congenital transmission of Chagas Disease in immigrants from Latin American countries resident in Barcelona were performed with parasitological techniques (direct examination and culture), serological techniques (ELISA with recombinant antigens, conventional ELISA, indirect immunofluorescence and Western blot) and molecular techniques (PCR). Here, we present and discuss the results.

**Key words:** Chagas disease. Immunodiagnosis. PCR.

## Introducción

La efectividad de las distintas técnicas de diagnóstico (parasitológicas, serológicas y moleculares) para la enfermedad de Chagas está íntimamente ligada al contexto clínico y epidemiológico en el que se aplican. Las técnicas parasitológicas son de gran efectividad para el diagnóstico de las formas agudas de la enfermedad; sin embargo, son poco útiles en el caso de las formas indeterminadas y crónicas.

El inconveniente principal de las pruebas serológicas en la infección por *Trypanosoma cruzi* reside en que éstas permanecen positivas en ausencia del parásito durante un largo periodo de tiempo después de un tratamiento efectivo. La detección del ADN del parásito en sangre periférica mediante PCR es especialmente útil ya que incrementa la sensibilidad de las pruebas parasitológicas en enfermos no tratados y permite hacer un se-

guimiento más eficiente y evaluar posibles fallos terapéuticos en enfermos sometidos a terapia específica<sup>1</sup>.

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos al aplicar diversas técnicas diagnósticas, en el cribado serológico, diagnóstico y seguimiento de la enfermedad de Chagas en inmigrantes procedentes de zona endémica de la enfermedad, residentes en Barcelona. Se trata de un estudio preliminar que, junto a la información existente en la bibliografía, puede permitir seleccionar las técnicas que mejor se adapten a las necesidades de cribado y diagnóstico en nuestro entorno.

## Material y métodos

**Sujetos de estudio:** Pacientes procedentes de Latinoamérica, atendidos en los dispensarios de Medicina Tropical del Hospital Clínico (HCP) y del CAP Drassanes de Barcelona; mujeres gestantes procedentes de zona endémica atendidas en el Servicio de Ginecología y Obstetricia del HCP; recién nacidos de madres seropositivas al antígeno de *T. cruzi* y niños procedentes de zona endémica atendidos en el Hospital de Sant Joan de Déu de Barcelona y Hospital de Sant Camil de Sant Pere de Ribes, Barcelona.

## Técnicas aplicadas

- Técnicas parasitológicas: examen directo y cultivo en medio de NNN de sangre total y capa monocítica. Los cultivos se revisaron y resembraron a intervalos quincenales y se descartaron a los tres meses de negatividad.
- Técnicas serológicas:
  - ELISA con antígenos recombinantes (BioELISA Chagas, Biokit S.A., Lliçà d'Amunt, Barcelona, España) (ELISAr).
  - ELISA convencional (ELISAc) propio. Los sueros se analizaron a una dilución 1:200. El conjugado enzimático utilizado fue Proteína A-Peroxidasa (Pierce) a una dilución de trabajo 1:30.000. Como sustrato se utilizó la orto-fenilén diamina (OPD).
  - IFI, con FluolineG (Bio-Merieux) a la dilución 1:200.
  - Western Blot (WB), kit comercial de LDBIO Diagnostics (Francia) con antígeno de *L. infantum*.

- Técnicas moleculares: *Nested* PCR con los iniciadores externos TCZ1 y TCZ2 e internos TCZ3 y TCZ4<sup>2</sup>, que amplifican un fragmento de 149 pb de una secuencia repetitiva del DNA nuclear de 195 pb (~100.000 copias por parásito).

## Resultados

**Cribado serológico y diagnóstico.** El cribado serológico de la enfermedad de Chagas se realizó mediante el ELISAr. En los casos de sospecha de enfermedad de Chagas, en base a la clínica, serología o antecedentes epidemiológicos, se practicaron como pruebas confirmatorias un WB heterólogo con antígeno de *L. infantum*, examen directo, cultivo y PCR con sangre total y capa monocítica. 48 muestras fueron positivas en ELISAr (ratio  $\geq 1$ ), en 14 de las cuales se detectó ADN del parásito mediante PCR. La PCR fue positiva en el 41% de las muestras de sangre procedentes de pacientes con una tasa de IgG específica elevada (ratio  $> 5$  en ELISAr) y negativa en la totalidad de los pacientes con valores de ELISAr inferior a 5. Tan sólo se obtuvo positividad parasitológica (examen directo y cultivo) en la sangre de un recién nacido hijo de madre chagásica.

El suero de enfermos chagásicos revela en el antígeno de *L. infantum*, mediante WB, un patrón polipeptídico muy característico con bandas de 30, 33, 39 y 52 kD. El análisis mediante este WB heterólogo de los sueros de pacientes con ratios ELISAr bajos (entre 1 y 3) (Tabla 1), permite distribuirlos en dos grupos:

- Sueros de pacientes que revelan el patrón característico chagásico, en su mayoría procedentes de niños nacidos de madres chagásicas en los que se detectan anticuerpos residuales de transferencia materna. La positividad del WB heterólogo coincidió, con una sola excepción, con la de ELISAc.
- Sueros que revelan patrones distintos, en su mayoría procedentes de adultos sanos en los cuales la infección no pudo confirmarse mediante PCR y que fueron negativos mediante ELISAc e IFI.

En algunos casos, la repetición de la analítica situó el valor de ELISAr a uno u otro lado de la línea de corte (Tabla 1, muestras 3Tc y 4 Tc).

### Análisis comparativo de distintas técnicas serológicas para el cribado de la enfermedad de Chagas

Dada la recomendación de efectuar dos técnicas serológicas distintas y simultáneas, para el cribado de la enfermedad de Chagas, se consideró oportuno ensayar la sensibilidad y especificidad de un ELISA convencional propio (ELISAc) y la IFI. Se trataba únicamente de corroborar lo que ya está ampliamente descrito en la literatura<sup>3</sup>. Para ello se aplicaron las tres técnicas a analizar (ELISAr, ELISAc e IFI) a 10 sueros procedentes de donantes de sangre de área no endémica; 10 sueros de pacientes con leishmaniosis visceral residentes en Barcelona, para determinar el grado de reactividad cruzada; 13 sueros de pacientes con diagnóstico de Chagas (ELISAr, WB y PCR) y 15 con serologías bajas al emplear ELISAr (Tablas 1-3). La aplicación de ELISAr, ELISAc e IFI a 10 sueros procedentes de donantes de sangre de área no endémica dio un resultado débilmente positivo (título 1/100) mediante IFI en uno de los sueros, siendo negativas las restantes determinaciones.

### Análisis de la posible transmisión congénita

Para detectar la transmisión congénita del parásito se efectuó el análisis parasitológico, serológico y molecular de madre e hijo. Para diferenciar entre

Tabla 1. Resultados comparativos de distintas técnicas serológicas en sueros para los cuales el cribado mediante ELISAr dio valores próximos al umbral de positividad

Muestra	ELISAr	ELISAc	IFI	WB
3Tc	1,9/0,5	0,669	1/200	pos
4Tc*	1,5/0,6/1,2	0,263	<1/25	pos
2-16Tc*	0,8	0,153	<1/25	pos
20Tc	1,1	0,117	<1/25	neg
21Tc	1,3	0,115	<1/25	neg
2-21Tc	1,1	0,112	<1/25	neg
22Tc	1	0,144	1/50	neg
2-22Tc	0,7	0,127	1/50	neg
2-30Tc*	2	1,488	1/400	pos
2-32Tc*	2	1,216	1/100	pos
2-33Tc*	1,4	0,437	1/50	pos
47Tc	2,1	0,065	<1/25	neg
48Tc	1,1	0,115	<1/25	neg
CHA 2-0002	1,5	0,108	<1/25	pos
CHA 2-0002/2	0,7	0,105	<1/25	neg

Cut-off: ELISAr (ratio)  $\geq 1$ , ELISAc (D.O.)  $\geq 0,150$ , IFI (dilución)  $\geq 1/100$ .

\* Hijo de madre seropositiva al antígeno de Chagas.

Tabla 2. Sensibilidad de las técnicas de cribado. Resultados obtenidos en pacientes chagásicos

Muestra	ELISAr	IFi	ELISAc
50	7,4	1/800	2,287
51	7,4	>1/1600	2,452
52	8,5	1/1600	2,499
2-13	7,5	1/1600	1,500
2-40	7,6	>1/1600	2,166
53	5,3	1/800	2,359
54	7,4	1/800	2,324
56	8,8	>1/1600	2,589
38	8,7	1/800	2,090
2-15	8,8	1/1600	2,575
39	8,1	1/1600	2,155
41	4	1/1600	1,846
8	7,5	1/1600	2,445

Cut-off: ELISAr (ratio)  $\geq 1$ , ELISAc (D.O.)  $\geq 0,150$ , IFI (dilución)  $\geq 1/100$ .

Tabla 3. Reacciones cruzadas con *Leishmania infantum*. Resultados de las técnicas de cribado al ser aplicadas a pacientes con leishmaniosis visceral

Muestra	ELISAr	ELISAc	IFI
28-527	1,7	1,128	1/1600
21-534	0	0,276	1/1600
21-432	0,09	0,253	1/400
26-456	1,2	0,785	-
26-400	0,05	0,303	1/400
7-575	0,03	0,376	1/800
620	0,04	2,258	>1/1600
560	0,2	2,321	1/100
8-585	0,07	0,422	1/1600
665	0,01	0,645	1/800

Cut-off: ELISAr (ratio)  $\geq 1$ , ELISAc (D.O.)  $\geq 0,150$ , IFI (dilución)  $\geq 1/100$ .

anticuerpos de transmisión materna y de producción propia en recién nacidos, se efectuó la técnica del WB heterólogo, en paralelo, con los sueros de ambos y se observó el patrón antigénico revelado en uno y otro caso.

Los sueros procedentes de recién nacidos y lactantes (7 casos), hijos de madres con serología positiva fueron también positivos en ELISAr, casi siempre con valores inferiores en el niño que en la madre. El patrón de WB revelado por los sueros de madre y recién nacido fue prácticamente idéntico en el momento del parto, disminuyendo progresivamente el número de bandas, al mismo tiempo que el ratio ELISAr, en los controles posteriores del niño, en ausencia de infección y tratamiento. La serología permaneció positiva en los controles efectuados a los 3 y 4 meses del nacimiento. El único caso de infección congénita detectada mediante pruebas parasitológicas negativizó el ELISAr ( $r=0,5$ ) y la PCR a los dos meses del tratamiento. Un niño asintomático de dos años, nacido en Barcelona, hijo de madre seropositiva, resultó ser también seropositivo en ELISAr ( $r=7,2$ ), el patrón de WB revelado por su suero presentó diferencias significativas con el de la madre y la PCR de ambos fue positiva, por lo que se consideró un caso de transmisión congénita autóctona.

## Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos concluimos que:

- Las tres técnicas ensayadas, ELISAr, ELISAc e IFI presentan una elevada sensibilidad para el cribado de portadores de *T. cruzi*.
- La subjetividad en la lectura, la dificultad para discernir entre fluorescencia específica y ruido de fondo, en sueros poco diluidos, y la dificultosa manipulación de un elevado número de muestras, hacen de la IFI una técnica poco apropiada para el cribado serológico de la enfermedad de Chagas en bancos de sangre y estudios en los que se requiera evaluar un gran número de muestras.
- Se detectan reacciones cruzadas con *Leishmania* al emplear las tres técnicas de cribado ensayadas. Dichas reacciones cruzadas, tal como

era esperable, son muy manifiestas al utilizar técnicas convencionales (ELISAc e IFI), pero también se detectan a pequeña escala con el ELISAr.

- Los valores próximos al umbral de positividad en ELISAr son de difícil valoración e incluyen un gran número de determinaciones inespecíficas.
- El WB heterólogo utilizado (con antígeno de *L. infantum*) permite dirimir serologías dudosas y resultados contradictorios en el cribado serológico y contribuye a la detección de la infección congénita.
- La PCR *nested* aplicada tiene una notable sensibilidad para el diagnóstico de las formas crónicas e indeterminadas de la enfermedad.

## Agradecimientos

El trabajo se ha realizado con la ayuda financiera de la beca "La infección por *Trypanosoma cruzi* en la población inmigrante procedente de América Central y del Sur", otorgada por la Fundación Bayer, en el marco del Programa Salud y Calidad de Vida. Parte de los kits de diagnóstico utilizados han sido amablemente cedidos por Biokit S.A.

Se agradece el soporte técnico realizado por Dña. Silvia Tebar.

## Bibliografía

1. Galvao LMC, Chiari E, Macedo AM, Luquetti AO, Silva SA, Andrade ALSS. PCR assay for monitoring *Trypanosoma cruzi* parasitemia in childhood after specific chemotherapy. *J Clin Microbiol* 2003;41:5066-70.
2. Barbosa Marcon GL, Durante Andrade P, Martins de Albuquerque D, et al. Use of a nested-polymerase chain reaction (N-PCR) to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients and patients with doubtful serologies. *Diag Microbiol Infect Dis* 2002;43:39-43.
3. Anónimo. Control of Chagas Disease: second report of the WHO expert committee. *WHO Technical Report Series* 2002;905.