

# Prevalencia de anticuerpos frente a *Trypanosoma cruzi* en población inmigrante de la ciudad de Valencia

M<sup>a</sup> José Giménez-Martí  
 Ana Gil-Brusola  
 M<sup>a</sup> Dolores Gómez  
 Javier Pemán  
 Miguel Gobernado

Servicio de  
 Microbiología  
 Hospital La Fe  
 Valencia

## Resumen

**Introducción:** La enfermedad de Chagas es endémica en Centro y Sudamérica. Las vías transfusional, transplantaria y donación de órganos son las de mayor importancia en nuestro medio. Conviene conocer la prevalencia de anticuerpos anti-*T.cruzi* en la población procedente de áreas endémicas, debido al posible estado de portador asintomático y transmisor en la fase crónica.

**Métodos:** Análisis de 432 sueros de inmigrantes recogidos entre mayo y agosto de 2001 por ensayo inmunoenzimático (ELISA), inmunoprecipitación (IP) e inmunofluorescencia indirecta (IFA) frente a *T.cruzi*; estudio posterior de anticuerpos frente a *Leishmania spp.* y *Treponema pallidum*.

**Resultados:** 30 muestras (6,9%) fueron positivas por la técnica de cribado. De ellas, 16 (53,4%) también lo fueron por IP y por IFA. Todos los sueros positivos por las tres técnicas, excepto uno, tenían anticuerpos frente a *L. infantum* y sólo uno frente a *T. pallidum*.

**Discusión:** Un 3,7% de los sueros fueron positivos por las tres técnicas empleadas, dato similar al de otros estudios. La mayoría correspondían a bolivianos, lo que coincide con la prevalencia de la infección en Sudamérica, y a mujeres. El diagnóstico de laboratorio presenta limitaciones al no existir un gold standard, no estar comercializada una prueba de confirmación y haber reacciones cruzadas con otros parásitos. La erradicación del vector y la interrupción de cualquier transmisión sigue siendo la vía principal para controlar esta endemia.

**Palabras clave:** *Trypanosoma cruzi*. Prevalencia. Inmigrantes.

## Summary

**Introduction:** Chagas' disease is endemic in Central and South America and is mainly transmitted through blood transfusion, organ transplant and congenital infection in our Spanish environment. It is important to know the prevalence of anti-*T.cruzi* antibodies in people from the endemic areas who are now living in our country, due to possible transmission during the chronic, asymptomatic period.

**Methods:** Analysis of 432 sera collected from immigrants between May and August 2001 using an enzyme-linked

immunosorbent assay (ELISA), a particle gel immuno assay (IP) and an indirect immunofluorescence assay (IFA) for *T.cruzi*. In order to exclude cross-reaction, the presence of *Leishmania spp.* and *Treponema pallidum* antibodies was also tested.

**Results:** 30 samples (6.9%) were positive with the ELISA and 16 (53.4%) of them also reacted to IP and IFA. All except one of the sera which were positive through the three techniques had antibodies to *L. infantum* and one of them to *T. pallidum*.

**Discussion:** 3.7% of all the sera analyzed were positive for the three techniques, a finding that correlates with results from other studies. Most of them were from women and from immigrants from Bolivia, the country with the highest prevalence of this disease. Laboratory diagnosis is limited by the absence of a gold standard, the presence of cross-reactivity with other parasites and the fact that there is no commercially available confirmatory assay. Vector eradication and interrupting any pathway of transmission is the main approach to combating the disease's endemicity.

**Key words:** *Trypanosoma cruzi*. Prevalence. Immigrants.

**"La política de inversiones en esta epidemia silenciosa y silenciada, hoy por hoy, niega incluso el derecho a conocer de qué se muere."**

E. Galeano. *Chagas, una tragedia silenciosa*  
 Médicos Sin Fronteras. 2005

## Introducción

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una enfermedad ampliamente distribuida en Centro y Sudamérica. Constituye una de las mayores endemias en esta zona y afecta a una población de entre 5 y 6 millones de personas, y 25 millones con riesgo de contraerla<sup>1</sup>.

Su agente etiológico, el *Trypanosoma cruzi*, es un protozoo flagelado que presenta distintas formas o estadios celulares según se encuentre en el huésped vertebrado o en el vector invertebrado<sup>2</sup>. Su ciclo biológico se desarro-

Correspondencia:  
 M<sup>a</sup> José Giménez Martí  
 Avda. Campanar, 21  
 46009 Valencia  
 E-mail:  
 gimenez\_mar@gva.es

lla exclusivamente en el continente americano entre los paralelos 35N y 49S, aproximadamente. La infección se adquiere por distintas vías: artrópodo vector, transfusional, transplacentaria, trasplante de órganos, accidente de laboratorio, vía digestiva o a través de la leche materna. La principal vía, aunque exclusiva de América Latina, es la forma vectorial, a través de las heces de insectos hematófagos de la familia *Reduviidae*. En áreas no endémicas las vías de transmisión de mayor riesgo son la transfusional, la transplacentaria y la donación de órganos<sup>3,4</sup>.

La enfermedad de Chagas presenta una primera fase aguda de multiplicación local, que suele pasar desapercibida y puede durar entre uno y dos meses. Tras ella, los pacientes permanecen asintomáticos en la mayoría de los casos pasando a una forma latente o indeterminada, de duración variable (10-15 años), en la que el parásito se acantona en los tejidos. Sin embargo, entre un 15 y un 30% de los inicialmente infectados desarrollan daño orgánico, con sintomatología principalmente cardíaca y digestiva en esta fase crónica de la enfermedad. Los pacientes que presentan la forma indeterminada y fase crónica son los que mayor riesgo de transmisión constituyen en áreas no endémicas.

La detección del parásito en la fase aguda se realiza habitualmente mediante examen directo de la sangre del paciente, aunque también se emplean la técnica de PCR o el hemocultivo. Para el diagnóstico en la fase crónica, existen varias técnicas de laboratorio con buena sensibilidad, como son el enzimoimmunoensayo (ELISA), la inmunoprecipitación (IP) y la inmunofluorescencia indirecta (IFA). Ninguna de ellas está exenta de problemas a la hora de su interpretación por la aparición de reacciones cruzadas (*Leishmania spp*<sup>5</sup>, *Trypanosoma rangeli*<sup>6</sup>, *Treponema pallidum*<sup>7</sup> y factor reumatoide), y por la ausencia de una prueba de confirmación comercializada. Las técnicas de biología molecular (PCR), a pesar de su alta especificidad<sup>8,9</sup>, son de uso limitado en esta fase debido a que el parásito, en los enfermos crónicos, no siempre está presente en sangre periférica<sup>10</sup>.

En nuestro país, en los últimos años, se ha producido un aumento considerable de población inmigrante. La

Comunidad Valenciana era, en junio de 2004 y según datos del Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales, la tercera autonomía en número de trabajadores extranjeros dados de alta en la Seguridad Social. Según los datos del Padrón Municipal de 2004, en la ciudad de Valencia el 55,5% de población inmigrante procedía de Centro y Sudamérica, la mayoría de Ecuador (46,7%), Colombia (22,4%), Argentina (9%) y Bolivia (7,1%)<sup>11</sup>.

Por todo ello, es importante conocer la prevalencia de anticuerpos anti-*T.cruzi* en la población inmigrante de áreas endémicas por ser posibles portadores asintomáticos y, por tanto, transmisores del parásito por vía transplacentaria, donación de órganos o hemoderivados y, a su vez, poder beneficiarse de un diagnóstico, seguimiento clínico y tratamiento adecuados.

## Métodos

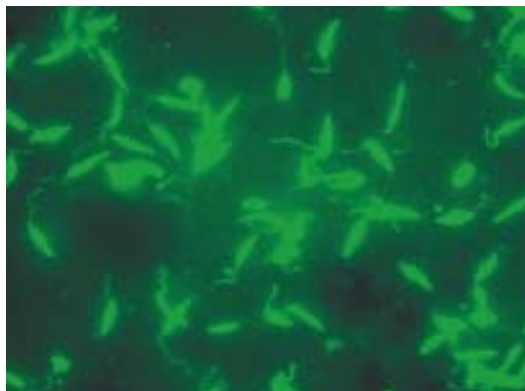
Se ha realizado un análisis retrospectivo de 432 muestras de un total de 1637 sueros que fueron enviados al Laboratorio de Microbiología del Hospital Universitario La Fe entre mayo y agosto de 2001. Tras la realización de diversas determinaciones, fueron conservados a -20°C hasta su utilización en este trabajo. Se seleccionaron 450 sueros de forma aleatoria con la ayuda de un software adecuado y se desecharon 18 por escaso volumen.

Las muestras procedían de población inmigrante de Sudamérica, que había acudido voluntariamente a los servicios médicos de la Cruz Roja de Valencia, con el fin de obtener la cartilla solidaria y legalizar su situación administrativa. En el momento de la extracción, se desconocía si los pacientes padecían signos y/o síntomas de enfermedad alguna.

Como técnica de cribado se utilizó un ELISA (ELISA-BLK) en microplaca (*Trypanosoma cruzi* IgG ELISA, BLK Diagnostics, Barcelona) que determina la presencia de anticuerpos de la clase IgG anti-*Trypanosoma cruzi* y como antígeno en la fase sólida, utiliza un lisado celular de cepas procedentes de Argentina, Brasil, Panamá y Chile. Se consideraron positivas aquellas muestras cuya densidad óptica (DO) fue superior a 0,2 (punto de corte prefijado por el fabricante) y el índice de cut-off (ICO) igual o mayor a 1,1.

Las muestras positivas fueron posteriormente analizadas por dos técnicas serológicas diferentes: a) inmunoprecipitación en partículas de gel (ID-test de anticuerpos Chagas, Particle Gel Immuno Assay (ID-PaGIA), DiaMed-ID, Suiza), que emplea como antígenos dos péptidos sintéticos (Ag2 y TcE) y detecta cualquier clase de inmunoglobulinas anti-*T. cruzi*; y b) inmunofluorescencia indirecta (IFA) (Ensayo IFA para la Tripanosomiasis, MarDx® Diagnostics, Inc., Trinity Biotech Company, Irlanda) que, como antígenos, utiliza epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Corpus Christi) desarrollados en medio de cultivo modificado de *Leishmania spp.*; se realizaron diluciones entre 1/4 y 1/2048 en PBS

Figura 1.  
Epimastigotes de *T.cruzi*  
(IFA)



considerándose significativos los títulos a partir de 1/32 (Figura 1).

Debido a las posibles reacciones cruzadas con *Leishmania spp.* y *T. pallidum*, las muestras reactivas por ELISA-BLK fueron analizadas mediante un ELISA que como antígeno utiliza un lisado celular de *Leishmania infantum*, interpretando como positivas aquellas con valores superiores a la media de la DO del suero cut-off (*Leishmania* ELISA IgG+IgM, VIRCELL, S.L., Granada) y mediante la determinación de la Reagina Plasmática Rápida (Macro-Vue™ RPR Card Antigen Suspensión, Becton Dickinson, USA). Los sueros RPR positivos, una vez titulados, se confirmaron mediante la técnica TPHA TEST KIT (Plasmatec Laboratory Products Ltd, UK) de hemoaglutinación indirecta frente a *T. pallidum*.

Para la realización e interpretación de reactividad, en todas las técnicas mencionadas se siguieron las instrucciones del fabricante.

## Resultados

Del total de las 432 muestras estudiadas, 185 sueros eran de personas procedentes de Ecuador (43%), 185 (43%) de Colombia, 41 (9%) de Bolivia, 8 (2%) de Argentina, 3 (1%) de Cuba, y los 10 restantes (2%) procedían de Brasil, Chile, Venezuela, México, Paraguay, Perú y Uruguay (Figura 2). El 52% de los sueros analizados correspondían a mujeres.

Según la técnica de ELISA-BLK, 402 muestras (93,1%) fueron interpretadas como negativas ( $ICO < 0,9$ ) y 30 sueros (6,9%) fueron positivos ( $ICO \geq 1,1$ ). De estos últimos, 21 (70%) pertenecían a mujeres. La distribución de resultados positivos por países, fue: Bolivia 31,7% (13/41), Argentina 12,5% (1/8), Colombia 6,5% (12/185) y Ecuador 2,2% (4/185). El ICO fue  $> 6$  en el 57% de las 30 muestras positivas y  $< 2$  en el resto. Todos los sueros de inmigrantes bolivianos tuvieron un  $ICO \geq 8,8$  al igual que el único suero positivo procedente de Argentina y uno de los sueros procedentes de Ecuador.

Las 30 muestras reactivas por ELISA-BLK fueron analizadas por la técnica ID-PaGIA resultando 14 sueros (46,6%) negativos y 16 (53,4%) positivos. Las muestras positivas por ambas técnicas, todas ellas con  $ICO \geq 7$ , procedían en su mayoría de Bolivia (13/16). La distribución de resultados positivos por países al emplear ambas técnicas no varía para Argentina y Bolivia y, sin embargo, para Colombia y Ecuador baja al 0,5%.

Al ser analizadas por IFA, todas las muestras positivas por ELISA-BLK tuvieron títulos  $\geq 1/16$ . A medida que aumentaba el ICO del ELISA-BLK aumentaba el título por IFA excepto para dos de ellas. Las negativas por ID-PaGIA dieron títulos entre 1/16 y 1/64, encontrándose cuatro de las positivas también dentro de este rango. El resto fue  $\geq 1/128$ .

De las 30 muestras positivas por ELISA-BLK, tres (10%) lo fueron también frente a técnicas no treponémicas (RPR)

y treponémicas (TPHA). Todos los sueros positivos por las tres técnicas empleadas fueron positivos para *L. infantum*, excepto uno que fue negativo por ID-PaGIA.

Todos estos resultados quedan reflejados en la Tabla 1.

## Discusión

En nuestro país es notable el aumento de inmigrantes procedentes de zonas donde es endémica la enfermedad de Chagas, lo que hace necesario realizar estudios de prevalencia de anticuerpos frente a *T. cruzi* para prevenir su posible transmisión en situaciones de embarazo, donación de órganos y transfusiones de sangre.

De los 432 sueros analizados, un 3,7% fue positivo por las tres técnicas empleadas. La mayoría de ellos correspondían a bolivianos (68,7%), lo que coincide con la distribución de la infección en Sudamérica, donde la mayor prevalencia entre donantes de sangre en 2001, se observó en Bolivia (99/1000 hab.) y la menor en Ecuador (1,5/1000 hab.)<sup>12</sup>. En nuestra serie, doce de los sueros positivos fueron de mujeres, a pesar de que la distribución del total de muestras estudiadas fue aproximadamente del 50% para cada sexo. El mayor número de mujeres infectadas podría contribuir a la propagación de la enfermedad por transmisión vertical, estimada entre un 1 y un 12% en Sudamérica<sup>13</sup>, aunque el número de muestras positivas en este estudio no es suficiente para afirmar que la enfermedad es más frecuente en mujeres.

Nuestro porcentaje de seropositivos (3,7%) es más alto que el encontrado en otros estudios preliminares realizados en España en bancos de sangre, en los que se dan cifras del 0,8% en la Comunidad de Madrid<sup>14</sup> y 0,95% en Barcelona<sup>15</sup>. En ambos, el mayor número de positivos provenían de Bolivia. Los autores no describen la procedencia del total de la muestra estudiada, por lo que no podemos comparar la tasa de positividad por países que en nuestro caso es de un 31,7% en Bolivia. Esta cifra, a pesar de ser muy elevada, entra dentro del rango descrito por otros autores para algunas zonas de Bolivia<sup>16</sup>, en las que la tasa de infección puede alcanzar el 51% en estudios de población no donante de sangre, como la de esta serie. En este estudio retrospectivo en población inmi-

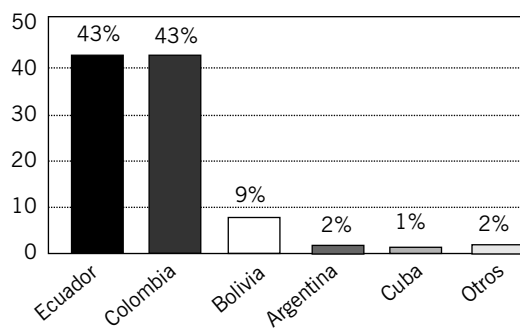


Figura 2. Porcentaje de muestras según país de procedencia

Tabla 1.  
Procedencia y resultados de los sueros con al menos una de las pruebas serológicas positivas

Suero	País	Sexo	<i>Trypanosoma cruzi</i>		Título IFA	<i>Leishmania infantum</i>	<i>Treponema pallidum</i>	
			ICO EIA (P≥1,1)	IDPaGIA		ICO EIA (P≥1,1)	RPR	FTA
1	Argentina	M	12,5	PD	1/512	2,94	N	N
2	Bolivia	M	12,5	P	1/1024	3,77	N	N
3	Bolivia	M	12,5	P	1/1024	3,77	N	N
4	Bolivia	M	12,5	P	1/1024	3,57	N	N
5	Bolivia	M	12,5	P	1/128	2,11	N	N
6	Bolivia	M	12,5	P	1/1024	3,29	N	N
7	Bolivia	H	12,5	P	1/128	1,78	N	N
8	Bolivia	M	12,5	P	1/512	3,03	N	N
9	Bolivia	H	12,5	P	1/1024	3,10	N	N
10	Bolivia	H	12,5	P	1/1024	3,47	N	N
11	Bolivia	M	12,5	P	1/1024	3,51	N	N
12	Bolivia	M	12,0	P	1/1024	3,11	N	N
13	Ecuador	M	10,0	P	1/64	1,27	N	N
14	Bolivia	M	9,0	P	1/64	1,71	N	N
15	Bolivia	M	8,8	P	1/32	2,08	1:1	P
16	Colombia	H	7,0	PD	1/32	0,48	N	N
17	Colombia	H	6,7	N	1/64	1,32	N	N
18	Colombia	H	2,0	N	1/64	0,36	N	N
19	Colombia	M	1,9	N	1/32	0,30	N	N
20	Ecuador	H	1,8	N	1/32	0,22	N	N
21	Colombia	M	1,8	N	1/32	0,72	1:4	P
22	Colombia	M	1,3	N	1/16	0,64	N	N
23	Colombia	M	1,3	N	1/32	0,23	1:4	P
24	Colombia	M	1,3	N	1/16	0,22	N	N
25	Colombia	M	1,2	N	1/32	0,62	N	N
26	Colombia	H	1,2	N	1/32	0,23	N	N
27	Colombia	M	1,2	N	1/32	0,47	N	N
28	Ecuador	H	1,1	N	1/32	0,20	N	N
29	Ecuador	M	1,1	N	1/32	0,55	N	N
30	Colombia	M	1,1	N	1/32	0,16	N	N

ICO= índice cut-off; IFA= inmunofluorescencia; H=hombre; M=mujer; EIA=enzimoinmunoanálisis; IDPaGIA=ensayo de partículas de gel; RPR=prueba no treponémica; FTA=prueba treponémica; N=negativo; P=positivo; PD=positivo débil.

grante, desconocemos la región de origen de la población boliviana estudiada.

En casi todos los sueros positivos para *T. cruzi* se detectó la presencia de anticuerpos frente a *L. infantum*, tal y como ha sido descrito por otros autores debido a la proximidad filogenética de ambos parásitos<sup>5</sup>. Esto obligaría a establecer un diagnóstico diferencial mediante una técnica serológica de confirmación, en la actualidad no comercializada<sup>7</sup>, o mediante PCR, con el inconveniente de la parasitemia intermitente en la fase crónica ya descrita.

En el caso de los tres sueros reactivos para sífilis, dos de ellos no serían considerados como positivos para *T. cruzi* en nuestro estudio. No sabemos si pudieron contribuir al falso positivo del ELISA de cribado.

Un grupo del total de muestras analizadas lo constituyeron 12 sueros que fueron positivos por ELISA-BLK, negativos por ID-PaGIA, con títulos de IFA bajos y negativos para anticuerpos de *L. infantum*, pudiéndose interpretar como falsos positivos por la técnica de ELISA-BLK (ICO<2). El punto de corte de este ensayo está prefijado, según el fabricante, en una D.O. igual a 0,2 lo que limita la especificidad de la técnica al considerar constantes las condiciones de realización del mismo. Según nuestra experiencia, este punto de corte debería ser más elevado o disponer de un factor de corrección para interpretar los resultados.

Por último, hubo dos casos, ambos de Colombia, que en la práctica diaria plantearían problemas de interpretación debido a que el resultado del ELISA-BLK y de la IFA

(1/64) fueron positivos, el de ID-PaGIA negativo y, uno de ellos, reactivo frente a *L. infantum* (ICO 1,32).

La OMS recomienda para diagnosticar la enfermedad de Chagas la realización de, al menos, dos técnicas diferentes<sup>1</sup>; sin embargo, según nuestros resultados hay un pequeño porcentaje de muestras en las que sería difícil establecer un diagnóstico claro utilizando sólo técnicas no confirmatorias. Por otra parte, sobre la base de estudios epidemiológicos se ha sugerido que una discrepancia de resultados puede representar una verdadera infección<sup>6</sup> ante una sospecha clínica.

En el particular caso de la enfermedad de Chagas no hay un *gold standard* que defina la situación de infectado a pesar de que la IFA es aceptada por algunos autores como tal<sup>17</sup>. En nuestra serie, ésta última ha presentado buena correlación con los resultados obtenidos por las dos técnicas de ELISA empleadas a títulos de al menos 1/64, pero no ha demostrado ser más específica.

Por todo ello, el diagnóstico de rutina de la enfermedad de Chagas en el laboratorio presenta problemas en la actualidad. Sólo los programas de prevención y erradicación del vector en las áreas endémicas, así como la interrupción de otro tipo de transmisiones pueden contribuir al fin de la epidemia. La enfermedad de Chagas está ligada a la pobreza y quizás esto explique la falta de métodos analíticos comercializados más certeros para su diagnóstico, pero no hay que olvidarse de que la presencia en Europa de inmigrantes latinoamericanos empujará a los gobiernos al establecimiento de programas de seguimiento y propiciar la investigación para su diagnóstico y tratamiento.

## Bibliografía

- Organización Mundial de la Salud. Control de la enfermedad de Chagas. Segundo informe del Comité de Expertos de la OMS. Serie de Informes Técnicos, 905. 2003.
- Pereira M. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. En: Wyler D (ed). *Modern parasite biology*. New York: WH Freeman Co, 1990:64-78.
- Bittencourt AL. Congenital Chagas disease. *Am J Dis Child* 1976;130(1):97-103.
- Schmunis GA. Prevention of transfusional *Trypanosoma cruzi* infection in Latin America. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94 (Suppl)1:93-101.
- Chiller TM, Samudio MA, Zoulek G. IgG antibody reactivity with *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* antigens in sera of patients with Chagas' disease and leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1990;43(6):650-6.
- Coura JR, Fernandes O, Arboleda M, et al. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996;90(3):278-9.
- Saez-Alquezar A, Sabino EC, Salles N, et al. Serological confirmation of Chagas' disease by a recombinant and peptide antigen line immunoassay: INNO-LIA chagas. *J Clin Microbiol* 2000;38(2):851-4.
- Junqueira AC, Chiari E, Wincker P. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-eastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996;90(2):129-32.
- Britto C, Cardoso A, Vanni CM, et al. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology* 1995; 110:241-7.
- Tanowitz HB, Kirchhoff LV, Simon D, et al. Chagas' disease. *Clin Microbiol Rev* 1992;5(4):400-19.
- Població de Nacionalitat Estrangera a la Ciutat de València. Documents i informes estadístics. Oficina d'Estadística. Ayuntamiento de Valencia. 2004.
- Schmunis GA, Cruz JR. Safety of the blood supply in Latin America. *Clin Microbiol Rev* 2005;18(1):12-29.
- Anónimo. Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003;36(6):767-71.
- Barea L, Gonzalez R, Bueno JL, et al. Seroprevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en donantes de sangre (estudio preliminar). *Enf Emerg* 2005;S1:40-2.
- Piron M, Maymo NR, Hernandez JN, et al. Bancos de sangre y enfermedad de Chagas: estado actual de la legislación española. *Enf Emerg* 2006;S1:45-7.
- Lisboa A. Transmissao Vertical da Doença de Chagas. Capítulo 2. Segunda edição. Editores: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Netto M. En: *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan SA., 200;16-20.
- Ferreira AW, de Avila SD. Laboratory diagnosis of Chagas' heart disease. *Sao Paulo Med J* 1995;113(2):767-71.