

# Mesa redonda: Bancos de sangre europeos e inmigración latinoamericana

**Moderador:** Dra. E. Castro  
Cruz Roja. Madrid

## Resultados preliminares del estudio en Banco de Sangre, Cataluña

Maria Piron<sup>1</sup>, Rosa M<sup>a</sup> Maymó<sup>1</sup>, Josep M. Hernández<sup>1</sup>, Mireia Vergés<sup>2</sup>, Josep Muñoz<sup>3</sup>, Montserrat Portús<sup>2</sup>, Natàlia Casamitjana<sup>1</sup>, Lluís Puig<sup>1</sup>, Joaquim Gascón<sup>3</sup>, Silvia Sauleda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Banc de Sang i Teixits. <sup>2</sup>Laboratorio de Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona. <sup>3</sup>Centre de Salut Internacional. Hospital Clínic i Provincial. Barcelona.

**Correspondencia:** Silvia Sauleda. Laboratori de Seguretat Transfusional. Banc de Sang i Teixits. Passeig Vall d'Hebron, 119-129. 08035 Barcelona. E-mail: ssauleda@vhebron.net

## Resumen

El aumento de población inmigrante procedente de zonas endémicas de Chagas ha creado la necesidad de una actuación en los bancos de sangre de nuestro país. Además, el reciente real decreto sobre hemodonación permite aceptar las donaciones de riesgo siempre que se realice el cribado para marcadores de *T. cruzi*. El objetivo principal del estudio iniciado en septiembre de 2005 en el Banc de Sang i Teixits es determinar la seroprevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en la población de donantes de riesgo en Cataluña. Se incluyeron en el estudio los donantes de riesgo de Chagas (nacidos, transfundidos o hijos de madre procedente de área endémica) y viajeros/residentes en estancias superiores a un mes. El test de cribado utilizado fue el ID-PaGIA Chagas antibody test (DiaMed). Como test suplementarios se utilizaron el método Bioelisa Chagas (Biokit) y un ELISA in-house con antígenos nativos. Entre Septiembre 2005 y Septiembre 2006, se han analizado 1770 donantes. Por grupos de riesgo, hubo 1524 (86%) donantes nacidos en área endémica, 37 españoles de madre originaria de zona endémica (2%) y 209 (12%) viajeros. Hubo 21 donantes inicialmente positivos en el cribado, de los cuales 11 se confirmaron positivos (0,62%). La mayoría de donantes positivos fueron bolivianos.

**Palabras clave:** Chagas. Seroprevalencia. Donación de sangre.

## Summary

The increasing population coming from Chagasic areas has forced blood banks in Spain to take preventive measures. The recent Blood Donation regulation

provides with the guidelines to screen blood donations at risk for anti-*T. cruzi* antibodies. The aim of the present study was to determine the prevalence of infection by *Trypanosoma cruzi* in blood donors at risk in Catalonia. The risk groups included were donors born or transfused in endemic areas and donors whose mother was born in endemic area. Travellers or residents in endemic areas for more than one month were also included. The screening method was ID-PaGIA Chagas antibody test (DiaMed). As supplementary test, Bioelisa Chagas (Biokit) and an in-house ELISA test with native antigens were used. Between September 2005 and September 2006, 1770 donors at risk were screened. According to risk groups, 1524 (86%) were donors born in endemic areas, 37 (2%) were donors whose mother was born in an endemic area and 209 (12%) donors had travelled or lived in endemic areas. Twenty-one donors were initially positive in the screening, of which 11 were confirmed positive for the presence of *T. cruzi* antibodies (0.62%). The majority of *T. cruzi* positive donors were Bolivians.

**Key words:** Chagas. Seroprevalence. Blood donation.

## Introducción

La llegada masiva de población inmigrante procedente de América Central y del Sur ha requerido una revisión de los criterios de selección, cribado y, en su caso, exclusión, de donantes de sangre con riesgo de transmitir la infección por *Trypanosoma cruzi*. Estos criterios han quedado reflejados en el Real Decreto sobre hemodonación (Real Decreto 1088/2005) en el capítulo de selección de donantes<sup>1</sup>. Así, los donantes con enfermedad de Chagas quedan excluidos de forma automática y definitiva. Igualmente, y en ausencia de prueba de cribado, quedan excluidos de la donación de componentes lábiles (concentrado de hematíes y plaquetas) los donantes nacidos en zona endémica, hijos de madre nacida en zona endémica y personas que han recibido transfusiones en zona endémica. Estos donantes pueden ser aceptados si la donación se limita a plasma para el fraccionamiento y, con una prueba de cribado para anti-*Trypanosoma cruzi* negativa, también como donantes de componentes lábiles.

Desde finales de 2005, numerosos bancos de sangre en España han implementado el cribado selectivo para Chagas en donantes de riesgo. En Septiembre de 2005, el Banc de Sang i Teixits de Catalunya, en colaboración con el Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia (Universidad de Barcelona) y el Centre de Salut Internacional (Hospital Clínic i Provincial, Barcelona) empezó el cribado de donantes de riesgo en el marco de un amplio estudio sobre enfermedad de Chagas en nuestro entorno. Nuestro objetivo

Tabla 1. Resumen de los datos epidemiológicos de los donantes con serología positiva para *Trypanosoma cruzi*

	Sexo	Edad	Origen	Ha vivido en área rural	Ha vivido en casa de adobe	Llegada a España	Ha regresado a su país
Don. 1	M	35	El Oro (Ecuador)	No	No	2000	Sí (2005)
Don. 2	M	35	Cochabamba (Bolivia)	Sí	Sí	2002	No
Don. 3	H	42	Mendoza (Argentina)	Sí	Sí	2002	No
Don. 4	M	36	Santa Cruz (Bolivia)	No	No	2005	No
Don. 5	H	38	Santa Cruz (Bolivia)	No	No	2004	No
Don. 6	H	46	Santa Cruz (Bolivia)	No	No	2003	No
Don. 7	M	31	ESPAÑA (residente Caracas)	Sí	-	2003	No
Don. 8	M	36	Cochabamba (Bolivia)	No	No	2003	No
Don. 9	M	40	Santa Cruz (Bolivia)	No	No	2003	No
Don. 10	H	49	San Juan (Argentina)	No	Sí	1988	No
Don. 11	M	51	San Estanislao/San Pedro (Paraguay)	No	No	1978	Sí (2006)

principal fue determinar la prevalencia de infección por *Trypanosoma cruzi* en nuestra población de donantes.

### Material y métodos

El Banc de Sang i de Teixits definió los siguientes grupos de riesgo de infección por *T. cruzi*: 1. donantes nacidos en área endémica; 2. donantes cuya madre ha nacido en área endémica; 3. cualquier donante transfundido en área endémica y 4. cualquier donante que haya viajado o residido en área endémica por un periodo superior a un mes. Los tres primeros criterios se corresponden con el Real Decreto, mientras el cuarto es un grupo adicional para maximizar la seguridad de las donaciones. Si el donante se encuentra en alguna de las anteriores situaciones, el médico entrevistador activa el cribado selectivo para *T. cruzi* en el sistema informático y la donación de sangre no puede ser liberada sin un resultado negativo específico de *T. cruzi*, además de los marcadores comunes (VHC, VIH, VHB, sífilis). En el presente estudio se han incluido los donantes de riesgo que han aceptado participar mediante un consentimiento firmado y que han cumplimentado un cuestionario epidemiológico dirigido.

La prueba serológica utilizada en el Banc de Sang i Teixits es el test de detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* de DiaMed (ID-PAGIA Chagas antibody test)<sup>2</sup>. Según el fabricante, el test está validado para el cribado de donantes de sangre. Todas las muestras son luego procesadas en el Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona con un método de detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* basado en antígenos recombinantes<sup>3</sup> (Bioelisa CHAGAS, Biokit) y, en caso de un resultado positivo en ID-PAGIA y/o Bioelisa, retestadas con un ELISA in-house de antígenos nativos. Todas las muestras inicialmente reactivas con el test ID-PAGIA DiaMed se analizan para ADN del parásito por PCR a tiempo real (sensibilidad 2 parásitos/mL).

### Resultados

Del día 1 de septiembre 2005 hasta el 15 de septiembre de 2006 (fecha final de inclusión), se han analizado un total de 1770 donantes repartidos entre nacidos en área endémica (1524; 86%), viajeros o residentes (209; 12%) e hijos de madre oriunda de área endémica (37; 2%). Sólo 21 donantes declararon haber sido transfundidos en área endémica. La distribución de los donantes por países queda reflejada en la Figura 1. Colombianos, argentinos

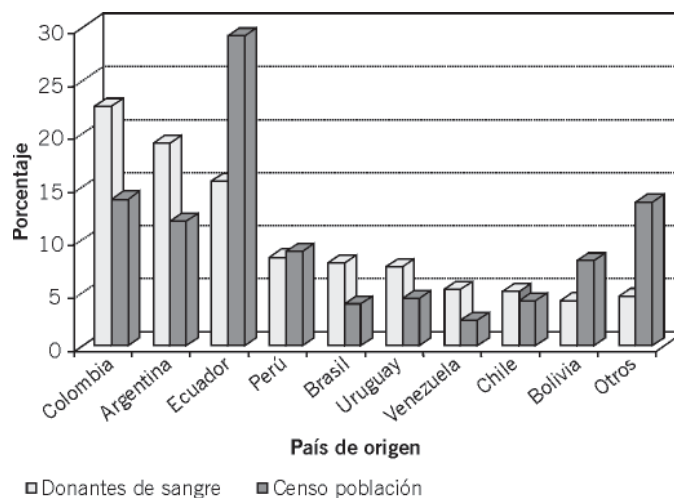


Figura 1. Distribución comparativa entre el censo de población de inmigrantes latinoamericanos de Cataluña (Instituto Nacional de Estadística, 2005) y el país de origen de los donantes incluidos en el estudio

y ecuatorianos representan más de la mitad de los donantes que acuden a nuestro Centro, en correspondencia con el censo de población inmigrante de Cataluña. El porcentaje de hombres fue del 51%, similar a la población total de donantes, y la edad media en el momento de la donación fue de 35 años, en contraste con los 41 años de media en el resto de donantes.

El cribado para anticuerpos anti-*T. cruzi* fue positivo en 21 donantes, de los cuales 11 resultaron también positivos en las dos pruebas confirmatorias de ELISA. Uno de ellos fue también positivo en la PCR a tiempo real. Paralelamente, 14 donantes negativos para la prueba de cribado fueron positivos en la prueba de ELISA con antígenos recombinantes (BioChagas) pero negativos para el ELISA de antígenos nativos. No hubo ningún donante con prueba negativa en el cribado y positiva en ambos métodos de ELISA. En total pues, 10 resultados de falso positivo en el cribado (0,56%), 14 falsos positivos en

la técnica confirmatoria con antígeno recombinante (0,79%) y 11 donantes con serología confirmada positiva para una prevalencia del 0,62% en el total de donantes analizados. La mayoría de donantes positivos se encontraron entre el grupo de nacidos en área endémica (10/1524 oriundos; 0,66%), mientras que una ciudadana española residente en Venezuela también fue positiva (1/209 viajeros/residentes; 0,48%). Las características de los donantes confirmados positivos están resumidas en la Tabla 1. El país que contribuye con más casos es Bolivia con 6 donantes positivos, mientras que los bolivianos representan sólo 59 donantes del total analizado (prevalencia *T. cruzi* entre donantes bolivianos: 10%).

Los 10 donantes con serología confirmada fueron derivados a la unidad especializada para su posterior seguimiento clínico.

## Conclusión

La legislación española prevé desde septiembre 2005 la aceptación de donantes de zona de riesgo de Chagas con resultado negativo en una prueba de cribado. En nuestro Centro, aproximadamente un 1% de las donaciones cumplen nuestros criterios de riesgo de Chagas, por lo que deben cribarse selectivamente. Es por lo tanto fundamental la correcta identificación de estos donantes durante la entrevista predonación. Dentro del presente estudio, la prevalencia de infección por *T. cruzi* ha sido del 0.62%, siendo los donantes bolivianos los que presentan más riesgo de infección. Aunque los oriundos de área endémica son nuestro grupo de riesgo más numeroso, un porcentaje

elevado de donantes de sangre que han visitado estos países declaran haber vivido en áreas rurales o casas de adobe, por lo que consideramos conveniente tenerlos en cuenta en el cribado.

## Agradecimientos

Este estudio forma parte del proyecto "Estudi de la infecció per *T. cruzi* en la població immigrant d'Amèrica Central i del Sud" finançat parcialment per la Fundació Bayer i l'Agència de d'Avaluació de Tecnologia i Recerca Mèdiques (AATRM)".

## Bibliografía

1. Real Decreto 1088/2005 por el que se establecen los requisitos técnicos y condiciones mínimas de la hemodonación y de los centros y servicios de transfusión. *Boletín Oficial del Estado* del 20 septiembre 2005, núm. 225, 31288-31304.
2. Rabello A, Luquetti AO, Moreira EF, Gadelha MdF, Dos Santos JA, de Melo L, Schwind P. *Serodiagnosis of Trypanosoma cruzi Infection Using the New Particle Gel Immunoassay - ID-PaGIA Chagas*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 1999;94:77-82.
3. Ferreira AW, Belem AZ, Lemos EA, Reed SG, 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;39:4390-5.

## Chagas disease screening in the French blood donor population. Screening assays and donor selection

A. Assal<sup>1</sup>, C. Aznar<sup>2</sup>

<sup>1</sup>French Blood Services. <sup>2</sup>Parasitology-Mycology, CH/UFR Médecine-EA 3593. French Guiana.

**Correspondence:** E-mail: azzedine.assal@efs.sante.fr

### Resumen

Debido al incremento de la prevalencia de la enfermedad de Chagas en la Guayana Francesa, las autoridades sanitarias decidieron interrumpir la donación de sangre en este territorio e implementar un cribaje para *Trypanosoma cruzi* en los donantes con riesgo de padecer la enfermedad.

La evaluación de diferentes pruebas serológicas permitió la selección de dos pruebas de ELISA, que se usarán simultáneamente como cribaje de rutina en los bancos de sangre. Una de las pruebas se basa en antígenos recombinantes y la segunda en antígenos crudos. En caso de discrepancia o como prueba de confirmación si los dos ELISA son positivos, se utilizará un método de inmunofluorescencia.

El cribaje se realizará en donantes de sangre de riesgo: personas nacidas en o de madre nacida en zona endémica y donantes que han viajado a América Latina independientemente de la duración de su estancia.

**Palabras clave:** Cribaje de *Trypanosoma cruzi*. Donantes de sangre.

### Summary

The identification of an increase in the prevalence of Chagas disease in the French Guiana led the French health authorities to the decision of halting blood collection in this French overseas territory and implementing *Trypanosoma cruzi* screening in the French at risk blood donors. Subsequently, an evaluation of the performances of different serological assays allowed the selection of 2 different ELISAs which will be used simultaneously in routine blood screening. One of the ELISA is based on recombinant antigens and the other one on crude antigens. An Immunofluorescence assay will be used as a confirmatory test in case of positivity of the 2 ELISAs or in case of discrepancy between the 2 screening assays.

Screening will be performed in at risk donors: people born in or from mother born in an endemic area and donors traveling to Southern America, regardless the stay length.

**Key words:** *Trypanosoma cruzi* screening. Blood donors.

### Introduction

Chagas disease, or American trypanosomiasis is endemic in Latin America, where an estimated 16 to 18 million persons harbor the parasite chronically and approximately 45,000 die each year of the illness<sup>1</sup>. In 2005, a French government survey showed an increase in the seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* in the French Guiana. As a result, blood collection was halted in this French overseas territory. Subsequently, the decision was made to implement *Trypanosoma cruzi* screening in the French blood donors in a targeted at risk

population. However, because of the lack of sensitivity and specificity of most assays<sup>2</sup>, the Pan American Health Organization recommended in 1994, the simultaneous use of at least two different serologic assays for *Trypanosoma cruzi* screening in blood donors<sup>3-4</sup>. Consequently, a study was performed to evaluate the analytical performances of 5 different ELISAs, in order to select an optimal test combination for French blood donor screening, and define the criteria of at risk donor eligibility.

## Material and methods

### Serological assays

Five different commercial ELISAs were evaluated, one with recombinant antigens, the Bioelisa Chagas® (Biokit, Spain) and 4 with crude antigens: ELISA Cruzei® (BioMérieux, France), Chagatek Elisa® (Lemos, Argentina), *T. cruzi* ELISA Test System-1® (Ortho Clinical Diagnostics, USA) and EIAgen *Trypanosoma cruzi* Ab® (manufactured by Adaltis, Italia and distributed in France by Ingen). All assays were performed according to manufacturer's instructions on a microplate based system: samples were dispensed using an automated pipetting instrument (MicroLab AT plus 2®, Hamilton) and the microplates were then processed on an automated Elisa processor (Fame®, Hamilton). Data management was performed in the laboratory information system (EOS®, Ortho Clinical Diagnostics, France).

All samples were tested by an indirect immunofluorescence assay (IFA): Immunofluor Chagas® (Biocientifica, Argentina).

### Samples and panels

Different panels and samples were used to assess the sensitivity, the specificity and the reproducibility of the different assays.

### Sensitivity

Anti-*Trypanosoma cruzi* performance panel PMT 201® (BBI, USA): 15 member undiluted panel with a single non-reactive sample (USA) and 14 reactive samples from southern and central American countries (Brazil, Argentina, Venezuela, Nicaragua and Honduras).

A set of 36 negative and positive donor samples, kindly provided by Dr Silva-Wendel, from the blood bank of Sao Paulo (Brazil). These samples were already tested by 3 different assays in Brazil: indirect hemagglutination test (IHA, BioMérieux), ELISA (Bioschile Abbott) and IFA (BioMérieux).

A set of 35 negative and positive patient samples, kindly provided by Dr Christine Aznar from the laboratory of Parasitology-Myology of the French Guyana. The patient samples were tested with a particle gel immunoassay (ID-PaGIA, Diamed, France), Bioelisa Chagas (Biokit) and an in-House PCR.

Blind testing of all donor and patient samples were subsequently followed by the comparison of our results with those provided by the two laboratories.

### Reproducibility

Reproducibility was assessed by testing a positive control sample: the Accurun 190® (BBI, USA). This sample was diluted 1/4 and tested in 8 replicates per run, in 3 different runs (24 values in total). Means of S/CO ratios, standard deviations and coefficients of variation were calculated for each assay.

### Specificity

The specificity of the tests was evaluated on donations from French blood donors who never traveled to endemic areas in the southern and central America.

## Results

All the assays could be properly adapted on the lab instruments except the EIAgen *Trypanosoma Cruzii* Ab® which required a pre-dilution 1/100,

in 2 different plastic neutral plates before dispensing in the sensitized microplate.

### Sensitivity

- Commercial BBI panel: all the positive samples of the panel were found positive by the 5 tested assays. The highest S/CO ratios are obtained with the EIAgen *Trypanosoma Cruzii* Ab®. This will be observed with both negative and positive samples tested with this reagent. The negative sample of the BBI panel tested negative by all the assays.
- Brazilian blood donor samples: 12 samples recorded as being negative by the Brazilian lab are found negative by all the assays. Twenty positive samples according to the Brazilian data, tested positive by the 5 tested ELISAs. The remaining 4 samples showed discrepancies and were considered as having inconclusive results.
- Patient samples from French Guiana: these samples were tested only with 4 ELISA's. Because of insufficient sample volume the EIAgen *Trypanosoma Cruzii* Ab® was not evaluated with these samples. On the 35 samples tested, 10 samples expected to be negative, were found negative by the 4 ELISA's. Data were not complete for 7 samples which could not be interpreted. The 18 remaining samples were recorded as being confirmed positive by the laboratory of French Guiana. On the 18 confirmed positive samples:
  - 16 samples tested positive by the Bioelisa Chagas® assay (Biokit)
  - 14 samples tested positive by the Elisa Cruzei® assay (BioMérieux)
  - Only 9 samples were found positive by *T.cruzi* ELISA Test System-1® (Ortho Clinical Diagnostics) and Chagatek Elisa® (Lemos, Argentina).
  - All the 18 samples were positive by Immunofluor Chagas® (Biocientifica)

One of the 18 positive samples was found negative by the 4 ELISAs. This sample was positive with Immunofluor Chagas® at the cut off dilution of the test (1/30). This sample was also positive by the particle gel immunoassay (ID-PaGIA, Diamed) and the in-house PCR.

- Reproducibility: the reproducibility coefficients of variation were 4,72%, 7,95 %, 15,68 % and 22,3 % for Bioelisa Chagas®, Chagatek Elisa®, *T. cruzi* ELISA Test System-1® and Elisa Cruzei® assay, respectively.
- Specificity: specificity was assessed on 440 to 530 blood donations, depending on the assay. Neither repeat reactive nor false positive sample were found. Therefore, based on the number of donations tested, the specificity is 100 % for the latter 4 ELISAs. Regarding the EIAgen *Trypanosoma Cruzii* Ab®, the signals obtained with this reagent for negative blood donations are 4 to 10-fold higher than those of the other tests. In addition, 10 % of blood donations (20/201) tested with this reagent had false initial reactive results. Hence, this reagent was rejected and did not undergo any further investigations.

## Conclusions

The study showed that no significant differences was observed when the ELISAs were evaluated by commercial panels with high titre antibodies or by blood donor samples, where the positive sample rate is very low. In contrast, the patient panel allowed to make the difference between the evaluated assays. The Bioelisa Chagas® (Biokit) and the Elisa Cruzei® (BioMérieux) showed the best combination of sensitivity and specificity. As the French strategy was based on the simultaneous use of 2 ELISAs, one with crude antigens and the other one with recombinant antigens, the two latter ELISAs were selected to be implemented in the routine screening of French blood donors. Positive samples, as well as discrepant results, will be confirmed with the IFA Immunofluor Chagas® (Biocientifica). Screening will be performed in at risk donors: people born in or from a mother born in an endemic area and donors traveling to Southern America, regardless the stay length. When returning from those areas, donors

will be deferred for 4 months, a period of time which it is consistent with the deferral period for malaria risk in the same areas. Donor reentry will be based on negative results with screening tests.

### References

1. Kirchoff LV, Paredes P, Lomeli-Guerrero A, *et al.* Transfusion associated Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: implications for transfusion medicine in the United States. *Transfusion* 2006;46:298-304.
2. Pirard M, Lihoshi N, Boelaert M, *et al.* The validity of serologic tests for *Trypanosoma cruzi* and the effectiveness of transfusional screening strategies in a hyperendemic region. *Transfusion* 2005;45:554-61.
3. Andrade AL, Martelli CM, Luquetti AO, *et al.* Serologic screening for *Trypanosoma cruzi* among blood donors in central Brazil. *Bull Pan Am Health Organ* 1992;26:157-64.
4. Luquetti AO. Use of *Trypanosoma* defined proteins for diagnosis - Multicentre Trial. Serological and technical aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1990;85:497-505.