

Cristina Riera¹
Mireia Vergés¹
Paulo López-Chejade¹
Maria Piron²
Joaquim Gascón³
Roser Fisa¹
Montserrat Gállego¹
Montserrat Portús¹

¹Laboratorio de Parasitología. Facultad de Farmacia, Universitat de Barcelona
²Laboratorio de Seguridad Transfusional. Banc de Sang i Teixits. Barcelona
³Centre de Recerca en Salut Internacional de Barcelona (CRESIB). IDIBAPS. Barcelona

Correspondencia:
Montserrat Portús
Laboratorio de Parasitología
Facultad de Farmacia
Avda. Joan XXIII, s/n. 08028 Barcelona
E-mail: mportus@ub.edu

Desarrollo y evaluación de una técnica ELISA con antígeno crudo de *Trypanosoma cruzi* para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas

ORIGINAL

Resumen

Fundamentos: La creciente inmigración procedente de América Central y del Sur ha convertido el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en un proceso habitual en los laboratorios españoles. El trabajo describe el desarrollo y evaluación de una técnica ELISA para el diagnóstico serológico de dicha enfermedad.

Métodos: El antígeno se obtuvo por sonicación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* y se fijó a la placa de microtitulación a una concentración proteica de 20 $\mu\text{g/ml}$. El conjugado enzimático fue la Proteína A-peroxidasa y el sustrato cromogénico el OPD. Se cuantificaron los resultados en forma de unidades (U) que relacionan la densidad óptica obtenida en los sueros problema con la de un suero calibrador establecido en 100 U.

Resultados: El umbral de positividad calculado sobre 325 sueros negativos fue de 20 U. La sensibilidad, determinada sobre 114 sueros de muestras con PCR positiva para *T. cruzi*, fue de 98,2% (intervalo de confianza 95%, 93,2-99,7%). La especificidad, determinada sobre 179 sueros de donantes de zona endémica, negativos en dos técnicas serológicas distintas, fue de 100% (IC 95%, 97,4-99,9).

El coeficiente de variación interplaca, calculado en 50 placas consecutivas, fue 0,09.

La comparación de los resultados con los obtenidos mediante una técnica ELISA con antígenos recombinantes, en 764 muestras de suero, aportó una correlación r de 0,85 ($p=0,01$) y una medida de acuerdo (kappa de Cohen) de 0,81.

Conclusión: La técnica desarrollada reúne los requisitos necesarios para ser aplicada en el diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas.

Palabras clave: Enfermedad de Chagas. *Trypanosoma cruzi*. ELISA. Diagnóstico serológico.

Summary

Introduction: The diagnosis of Chagas disease is now a routine procedure in Spanish laboratories due to the increasing immigration from Latin-American countries. The paper describes the development and evaluation of an ELISA technique for the serologic diagnosis of Chagas disease.

Methods: Antigen was obtained by sonication of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes and was used at a protein concentration of 20 $\mu\text{g/ml}$. The enzymatic conjugate was Protein A- peroxidase.

dase and the chromogenic substrate was OPD. Results were quantified as units (U) that relate the optical density obtained in the problem sera with that of a calibrator serum, arbitrarily set at 100 U.

Results. The cut-off was calculated on 325 negative sera and established at 20 U. The sensitivity was determined on 114 sera from blood samples with a positive PCR for *T. cruzi* and calculated to be 98.2 % (95% confidence interval, 93.2–99.7%). The specificity was determined on 179 sera from blood donors from endemic areas that were found to be negative by two serological techniques, and calculated to be 100% (95% CI, 97.4–99.9). The coefficient of variation between plates, calculated on 50 consecutive plates, was 0.09. The comparison of results with those obtained with another ELISA technique using recombinant antigens, on 764 sera, gave a correlation coefficient r of 0.85 ($p=0.01$) and an agreement coefficient (Cohen's kappa) of 0.81.

Key words: Chagas disease. *Trypanosoma cruzi*. ELISA. Serological diagnosis.

Introducción

En el transcurso de los últimos años, la enfermedad de Chagas, en España, ha pasado de ser una patología de hallazgo excepcional a un importante problema de salud pública, como consecuencia del notable incremento de la inmigración procedente de áreas geográficas donde dicha enfermedad es endémica. Por ello, su diagnóstico es en la actualidad frecuente en los laboratorios de nuestro país¹⁻⁵.

El diagnóstico de laboratorio basado en métodos parasitológicos presenta un notable valor durante las fases agudas de la enfermedad, en las cuales puede hallarse el parásito mediante técnicas diversas (frotis, gota gruesa, gota fresca, microhematocrito, concentración de Strout, cultivo), o parte de su genoma mediante PCR, en sangre. Sin embargo estas técnicas tienen baja sensibilidad durante las fases crónicas, en las que la serología es especialmente útil. No existe, sin embargo, una técnica de referencia, que pueda considerarse el *gold standard*. Dada la distinta capacidad inmunogénica de las distintas cepas del parásito, la distinta respuesta inmune humoral que desarrolla cada paciente y las reacciones cruzadas que pueden obtenerse, especialmente con otros tripanosomátidos cuando se utilizan antígenos crudos del parásito, se recomienda que el diagnóstico serológico se realice siempre mediante dos técnicas que utilicen antígenos o principios distintos^{6,7}.

El notable incremento de las solicitudes de determinaciones serológicas de la Enfermedad de Chagas en los laboratorios de microbiología españoles, junto con la nueva reglamentación de Bancos de Sangre, que conlleva la investigación de esta enfermedad en todas las personas procedentes de América Central y del Sur, ha originado la continua introducción de kits de diagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi* en España. Tests que tienen, en general, una buena sensibilidad y especificidad, que han sido sometidos a procesos de acreditación y que presentan utilidades distintas de acuerdo con su formato y prestaciones.

En el año 2003, la RIVEMTI (Red de Vigilancia Epidemiológica en Medicina Tropical y Salud Internacional) inició una serie de estudios clínicos y epidemiológicos sobre la Enfermedad de Chagas en Catalunya, en los que el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Farmacia de Barcelona (LP-FF-UB) actúa como laboratorio de referencia. En este marco y teniendo en cuenta las disponibilidades del mercado español en el momento de iniciar dichos estudios, que no incluía ninguna técnica que utilizara antígeno completo del parásito y fuera de cuantificación objetiva, se procedió al desarrollo de una técnica ELISA (ELISAc), que utiliza un antígeno crudo obtenido de epimastigotes de *T. cruzi*, que permite una lectura objetiva y valoración cuantitativa de la tasa de anticuerpos presentes en el suero. En el presente trabajo se describe el desarrollo de dicha técnica y su evaluación para el cribado y diagnóstico de la enfermedad de Chagas a la vez que se comparan los resultados con los obtenidos mediante un kit de ELISA comercial que utiliza antígenos recombinantes (BioELISA Chagas, Biokit, España) (ELISAr).

Material y métodos

Muestras analizadas

Se han utilizado muestras de sangre remitidas al LP-FF-UB para el diagnóstico o confirmación de la enfermedad de Chagas por distintas consultas de salud internacional y laboratorios de diagnóstico de Barcelona. Para los cálculos del umbral de positividad de la técnica desarrollada, especificidad y reacciones cruzadas se han utilizado muestras de sangre procedentes del Banc de Sang i Teixits de Catalunya (BST) y de la seroteca del LP-FF-UB. El número y origen de las muestras estudiadas para cada uno de los objetivos se indica en los apartados correspondientes del capítulo de resultados.

ELISA con antígeno crudo de epimastigotes. Descripción de la técnica

El antígeno empleado se obtiene de las formas epimastigotes de la cepa Maracay de *T. cruzi* (amablemente cedida por el Prof. A. Osuna, Universidad de Granada) obtenidas a partir de un cultivo de una semana de crecimiento, en medio LIT adicionado de un 10% de suero bovino fetal. La suspensión de epimastigotes se lava cuatro veces con PBS estéril y somete a seis ciclos de sonicación de 30 segundos, en baño de hielo. La concentración proteica del lisado total de epimastigotes se valora por el método de Pierce (NCA Protein Assay kit) y se lleva a una concentración de 1 mg/ml con PBS estéril. El antígeno así obtenido se reparte a razón de 1 ml por vial y se congela a -40°C hasta su utilización.

Para la sensibilización de las placas, el antígeno se diluye con tampón carbonato-bicarbonato, pH 9,6, para obtener

una concentración de trabajo de 20 μg de proteína/ml. La suspensión antigénica obtenida se distribuye a razón de 100 μl por pocillo en placas de microtitulación de poliestireno para ELISA (Costar) de fondo plano. Las placas se incuban una noche a 4°C. La suspensión antigénica no fijada se elimina y se procede al bloqueo de la placa añadiendo a cada uno de los pocillos 200 μl de PBS con 1% de leche descremada, durante una hora a 37°C. Se elimina la solución bloqueante y se lava la placa 3 veces con solución salina (0,9%) Tween 20 (0,05%)(SS-T) y una vez con solución salina, pH 7,2 (SS). Se envuelven las placas sensibilizadas en papel de aluminio y se almacenan a -40°C hasta su utilización.

La reacción inmunoenzimática se realiza mediante incubación de los sueros, 100 μl /pocillo, diluidos a 1:200 en tampón PBS-Tween 20 (0,05%)-leche (1%) (PBS-T-L), que se incuban en cámara húmeda durante una hora a 37°C. Se elimina el contenido de los pocillos y se realizan tres lavados con SS-T y uno con SS. Después del último lavado se adiciona el conjugado enzimático, 100 μl /pocillo de proteína A-peroxidasa (Pierce) a la dilución de 1:30.000 en PBS-T-L y la placa se incuba en cámara húmeda durante una hora a temperatura ambiente. Se elimina el contenido de la placa y lava, tal como se ha descrito anteriormente, y se adiciona el substrato cromogénico, 200 μl /pocillo de OPD (Sigma P-9187). Se incuba a 24°C en cámara húmeda durante aproximadamente 20 minutos, hasta que el suero utilizado como calibrador dé una coloración que, medida al espectrofotómetro (Titertek Multiskan Plus, MKII) a 450 nm, tenga una densidad óptica (D.O.) aproximada de 0,350. En este momento se para la reacción enzimática con 50 μl /pocillo de H_2SO_4 3M y se lee la D.O. a 492 nm.

Los resultados se expresan en unidades (U) que relacionan los valores de D.O.⁴⁹² de cada muestra problema y controles, con la D.O.⁴⁹² media de tres réplicas del suero calibrador (*pool* de sueros de pacientes con enfermedad de Chagas) arbitrariamente establecido en 100 U.

ELISA con antígenos recombinantes

Se ha utilizado un kit comercial (BioELISA Chagas, Biokit, Lliçà d'Amunt, España) (ELISAr) que usa una proteína de fusión de *T. cruzi*, compuesta por cuatro péptidos activos PEP-II, TcD, TcE y TcLo1.2. El conjugado enzimático incluido en el kit está constituido por anticuerpos de conejo anti-IgG y anti-IgM humanas marcados con peroxidasa. La técnica se ha empleado siguiendo las instrucciones del fabricante. De acuerdo con ellas, los resultados se expresan en forma de *ratio* que es la relación existente entre la absorbancia del suero problema y el valor umbral que se calcula añadiendo 0,300 a la absorbancia media obtenida de tres réplicas del suero control negativo.

PCR

La presencia de ADN de *T. cruzi* en la sangre de los pacientes se ha determinado mediante técnicas de PCR. Las técnicas utilizadas han sido una PCR anidada y/o una PCR a tiempo real⁹ que amplifican un amplicón de 149 y 166 pb respectivamente de la misma región del ADN genómico de *T. cruzi*.

Cálculos estadísticos

La variabilidad interplaca se ha calculado mediante el coeficiente de variación: desviación estándar/media de los valores obtenidos (U) de un suero control positivo incluido en cada una de las placas. La sensibilidad y especificidad de la técnica

a distintos puntos de corte se han determinado mediante el análisis de la curva COR. La correlación entre la tasa de anticuerpos específicos detectados en ELISAc y ELISAr se ha calculado mediante el coeficiente *r* de Pearson. La concordancia entre los resultados positivo/negativo obtenidos en ELISAc y ELISAr se ha determinado mediante el coeficiente de concordancia kappa de Cohen. Los intervalos de confianza de los porcentajes se han establecido para un riesgo del 5%.

Resultados

Umbral de positividad

El umbral de positividad se ha establecido en 20 U, que corresponde a la media más tres veces la desviación estándar de los valores obtenidos en 325 sueros de donantes procedentes de áreas endémicas y no endémicas para la enfermedad de Chagas. Los donantes procedentes de área endémica habían sido previamente testados, con resultado negativo, mediante dos técnicas comerciales (ELISAr y ID-PaGIA, DiaMed, Cressier sur Morat, Suiza), en el cribado serológico realizado en el BST.

Sensibilidad

La sensibilidad de la técnica se ha calculado a partir de 114 sueros procedentes de pacientes a los que se había detectando la presencia de ADN de *T. cruzi* mediante PCR. 112 de dichos sueros fueron reactivos en ELISAc, lo que aporta una sensibilidad a la técnica del 98,2 (IC 95%, 93,2-99,7)% (Figura 1) y dos de ellos no alcanzaron el umbral de positividad establecido. En uno de los casos se trataba de una paciente colombiana residente en Barcelona desde varios años, con grave afectación cardiaca, para la que se habían obtenido resultados no concluyentes en otro centro diagnóstico (IFI 1/80 \pm 1/160; ELISAr *r*=0,1). El segundo caso se trataba de un paciente asintomático, del que se

analizaron tres muestras de sangre en un plazo de tiempo de 33 meses, todas las cuales fueron positivas con valores próximos al umbral de positividad en ELISAr ($r=1,4; 1,4$ y $2,2$) y no reactivas en ELISAc (13, 13 y 17 U). La PCR fue positiva en la segunda de las extracciones y negativa en las otras dos. Las dos muestras no reactivas en ELISAc y con PCR positiva fueron también no reactivas mediante dos técnicas inmunocromatográficas realizadas (Chagas Stat Pak, Chembio Diagnostic Systems, Medford, NY, EUA y Simple/Stick Chagas, Operon, Zaragoza, España) y mediante un *Western Blot in house* con antígeno de epimastigotes de *T. cruzi*.

Cálculo de la especificidad

La especificidad de ELISAc se ha calculado a partir de 179 sueros de donantes de sangre en el *Banc de Sang i Teixits* procedentes de países endémicos para la enfermedad de Chagas, no reactivos en el cribado serológico mediante un test de aglutinación de partículas (DiaMed) ni en la confirmación mediante ELISAr. La totalidad de los sueros resultaron no reactivos para el ELISAc por lo que se obtuvo una especificidad del 100% (IC 95%, 97,4-99,9).

Curva COR

El análisis de la curva COR efectuada con los valores de ELISAc obtenidos en los sueros de donantes sanos y de pacientes con PCR positiva (Figura 2) señala la alta capacidad discriminante de la técnica desarrollada, con un área comprendida bajo la curva próxima a la unidad (0,999, IC95% 0,998-1,000). Dicha curva confirma el valor del punto de corte calculado para obtener una especificidad del 100% y establece el punto de corte en valores superiores a 10,5 U para alcanzar una sensibilidad del 100%, por lo que se establece una zona gris de resultados dudosos o no concluyentes comprendida entre 11

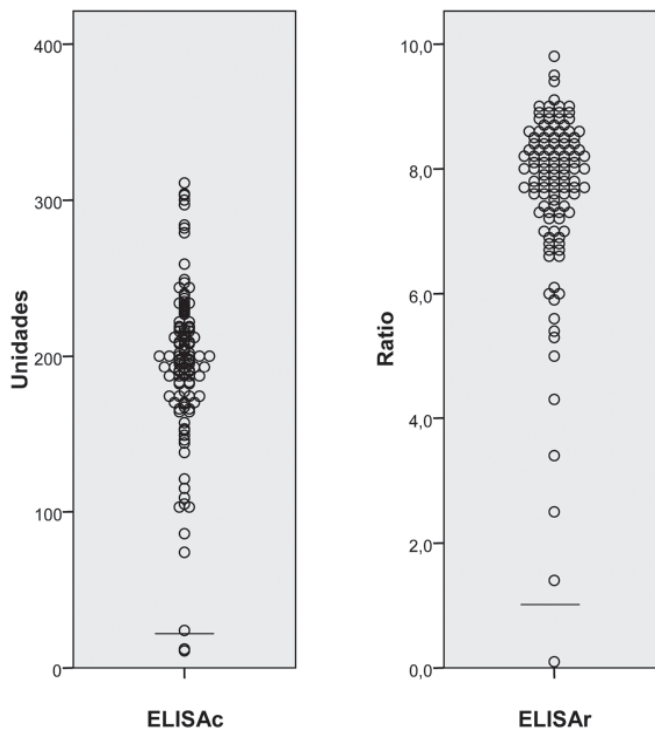


Figura 1. Reactividad en ELISAc y ELISAr de 114 sueros de pacientes con PCR positiva para *Trypanosoma cruzi*

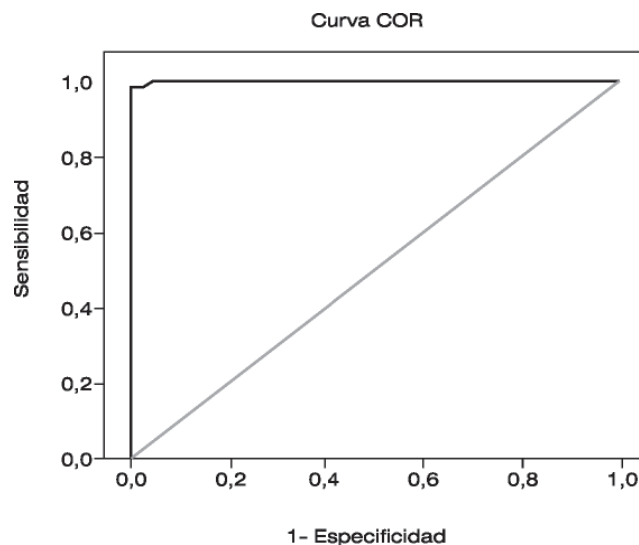


Figura 2. Curva COR para la determinación del punto de corte

y 20 U (Tabla 1), en la cual estarían comprendidos los dos sueros con PCR positiva que se consideraron no reactivos al aplicar el punto de corte de 20 U.

Variabilidad

El coeficiente de variación obtenido para un suero control positivo

Tabla 1. Valores de sensibilidad y especificidad de ELISAc a distintos puntos de corte. Coordenadas de la curva COR

Positivo si es mayor o igual que	Sensibilidad	1-Especificidad
1,0000	1,000	1,000
2,5000	1,000	0,923
3,5000	1,000	0,757
4,5000	1,000	0,563
5,2000	1,000	0,372
5,7000	1,000	0,368
6,5000	1,000	0,235
7,5000	1,000	0,134
8,5000	1,000	0,081
9,5000	1,000	0,061
10,5000	1,000	0,045
11,5000	0,991	0,032
12,5000	0,982	0,024
13,5000	0,982	0,016
14,5000	0,982	0,012
16,5000	0,982	0,008
18,5000	0,982	0,004
21,5000	0,982	0,000
49,0000	0,974	0,000

Tabla 2. Reactividad en ELISAc y ELISAr de 762 muestras de sangre remitidas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas

	ELISAc		Total
	Negativo	Positivo	
ELISAr negativo	138	17	155
positivo	26	581	607
Total	164	598	762

incluido en 50 placas de ELISA consecutivas, durante un periodo de un año, fue de 0,09.

Comparación de resultados entre ELISAc y ELISAr

La comparación de los resultados obtenidos mediante ELISAc y ELISAr se ha realizado a través del análisis de 762 muestras, recibidas en el LP-FF-UB para el diagnóstico o control de la enfermedad de Chagas. La correlación entre los valores cuantitativos aportados por ambas técnicas ha sido muy alta, ($r= 0,85$, $p=0,01$). Al analizar los resultados en su aspecto cualitativo (reactivo/no reactivo) se ha detectado discordancia de resultados entre ambos ELISA en 43 muestras, todas ellas confirmadas al repetir la determinación, lo cual proporciona una medida de acuerdo kappa de 0,81 (Tabla 2). En la mayoría de los casos se trataba de resultados próximos al punto de corte para ambas técnicas (Figura 3). Nueve muestras procedían de controles de posibles infecciones congénitas, realizados a niños de entre 5 y 8 meses de edad, hijos de madres infectadas por *T. cruzi*. Tres de ellos resultaron positivos en ELISAc y 6 en ELISAr. Catorce de las muestras analizadas habían sido remitidas al LP- FF-UB por otros centros de diagnóstico por falta de concordancia entre los tests aplicados (Inmunofluorescencia indirecta, Inmunocromatografía, Aglutinación de partículas o ELISA). Las 20 muestras restantes correspondían a cribados y controles de 13 pacientes asintomáticos.

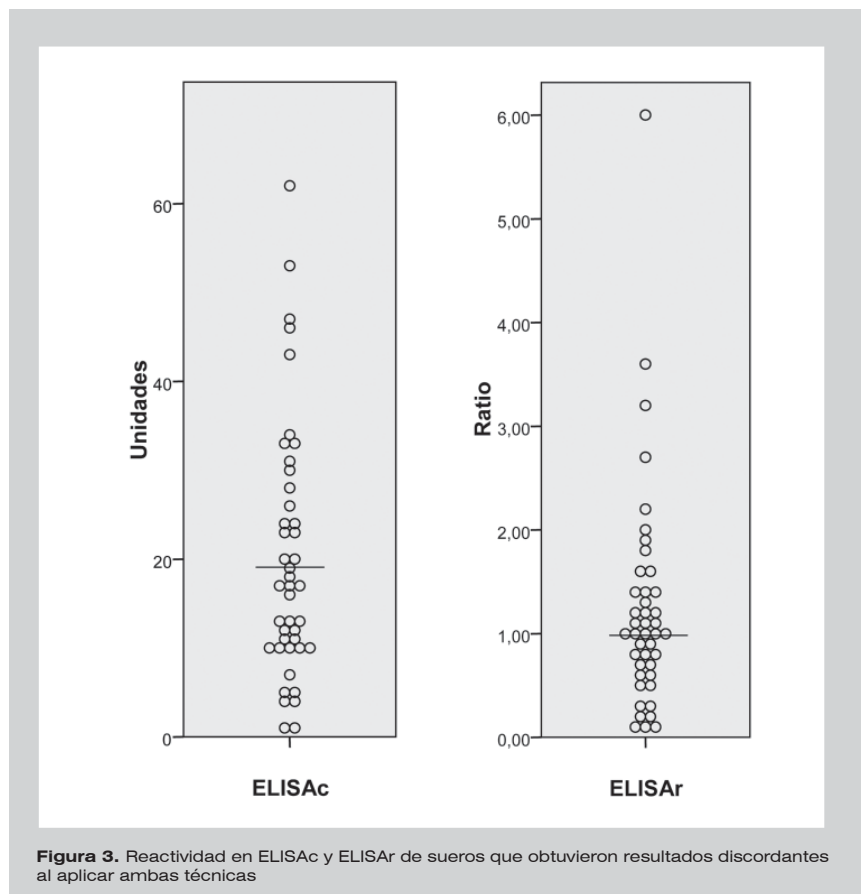


Figura 3. Reactividad en ELISAc y ELISAr de sueros que obtuvieron resultados discordantes al aplicar ambas técnicas

Once de ellas pertenecían a controles sucesivos (3,3,3 y 2 controles) realizados a cuatro pacientes. En tres casos las distintas tomas dieron resultados no concluyentes en ELISAc y fueron reactivas en ELISAr y en el cuarto caso fueron reactivas mediante ELISAc y no reactivas en ELISAr. En una de las muestras de uno de estos pacientes repetidamente reactivo tan sólo con ELISAr se detectó ADN del parásito mediante PCR anidada y PCR a tiempo real.

Reacciones cruzadas con *Leishmania*

Las reacciones cruzadas con otros tripanosomátidos se han determinado mediante 10 sueros de pacientes con leishmaniosis visceral por *Leishmania infantum* procedentes de la seroteca del LP-FF-UB. Todos ellos fueron reactivos en el ELISAc, con valores comprendidos entre 20 y 89 U, y uno de ellos lo fue también en el ELISAr (ratio=2,0) (Figura 4).

Discusión

El amplio abanico de técnicas serológicas utilizadas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas se diferencia fundamentalmente por el principio de la técnica y/o por los antígenos que utiliza, factores que condicionan su sensibilidad y especificidad. A estas dos cualidades, sensibilidad y especificidad, deben unirse otras en el momento de elegir una técnica de diagnóstico, tales como la facilidad de ejecución, posibilidad de automatización, reproducibilidad, coste, estabilidad de los reactivos.

Las técnicas rápidas y de lectura visual presentan inudables ventajas en trabajos de campo y estudios epidemiológicos de cribado, al no requerir ninguna infraestructura especial para su realización; sin embargo, para el diagnóstico de la enfermedad no hay duda de que las técnicas de ELISA ocupan un lugar primordial. La principal ventaja de las técnicas de ELISA radica en su versatilidad y facilidad de automatización así como en la lectura objetiva de los resultados. La inclusión de distintos tipos de antígenos, totales o recombinantes, puede dotar a la técnica de distintos grados de sensibilidad y especificidad.

A partir de los resultados expuestos podemos afirmar que la técnica de ELISA que hemos desarrollado presenta una alta sensibilidad, que no difiere de la obtenida en otros estudios que emplean también técnicas de ELISA con antígeno completo del parásito^{9,10}. La baja reactividad obtenida en dos muestras de sangre en las que se había detectado ADN del parásito concuerda con los datos aportados por otros en los que se cita la detección de ADN del parásito sin resultados serológicos positivos¹¹⁻¹³. Esta baja respuesta serológica en individuos infectados puede relacionarse con una fase aguda de la enfermedad cuando se trata de estudios realizados en áreas endémicas.

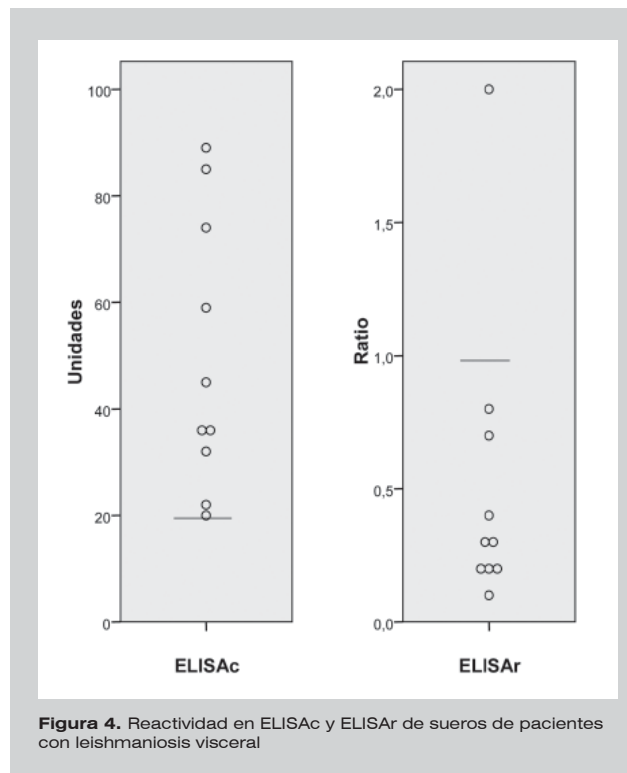


Figura 4. Reactividad en ELISAc y ELISAr de sueros de pacientes con leishmaniosis visceral

Sin embargo, no es este nuestro caso ya que se trata de personas con un periodo largo de residencia en España, por lo que se descarta una infección reciente. Nuestros resultados concuerdan con los aportados por Salomone, *et al.*, (2003) que detectan ADN de *T. cruzi* en tres pacientes con cardiomiopatía presumiblemente chagásica, residentes en el área urbana de Córdoba, Argentina, sin evidencia serológica de infección y que se consideran el resultado de infecciones crónicas en pacientes que no desarrollan una respuesta humoral frente a *T. cruzi* detectable¹³. No obstante, queremos incidir en la precaución con que siempre deben interpretarse los resultados de la PCR cuando éstos no concuerdan con otras evidencias analíticas, clínicas o epidemiológicas, a pesar de los controles de calidad incluidos en su ejecución.

Uno de los principales problemas que se plantea en el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas es la obtención de resultados no concluyentes. La falta de un *gold standard* que indique si un individuo está o no infectado y el hecho de que no exista ninguna prueba que sea 100% sensible y específica ha conllevado a la recomendación de la práctica de dos pruebas serológicas distintas, o tres para dirimir el empate en aquellos casos en los que las dos iniciales dan resultados diferentes, para realizar el diagnóstico correcto^{6,7,14}. Sin embargo es ésta una solución demasiado matemática del problema que no tiene en cuenta que, en la mayoría de los casos, la

discordancia de resultados se obtiene con títulos serológicos bajos, que bordean el umbral de positividad y en los cuales decidir la reactividad o no de una muestra conlleva una cierta imprecisión, aun teniendo en cuenta que la valoración se realice de forma objetiva. En esta situación, la repetición de la misma técnica con el mismo suero puede modificar el resultado final reactivo/no reactivo incluso cuando la variabilidad de la técnica sea muy pequeña. La imprecisión es todavía más evidente cuando la lectura de los resultados es subjetiva como sucede con las técnicas de inmunofluorescencia indirecta (IFI), hemaglutinación indirecta (HAI) o las técnicas rápidas de inmunocromatografía o aglutinación de partículas. Por otro lado, estas débiles reactividades son muchas veces consecuencia de reacciones inespecíficas, que pueden presentarse en técnicas distintas cuando utilizan los mismos antígenos. Ello es especialmente frecuente cuando se utilizan antígenos crudos del parásito, por técnicas de IFI, ELISA o HAI, que son las que más frecuentemente usan este tipo de antígenos. Junto a ello, la falta de reactividad del suero de algunos pacientes a algunos de los determinantes antigénicos del parásito puede conllevar a falsos negativos cuando se usan tests serológicos que utilizan antígenos recombinantes o fracciones específicas concretas.

Es difícil de cuantificar el porcentaje de resultados no concluyentes que se obtienen al realizar el diagnóstico serológico de esta infección. En nuestro caso han sido un 5,6% de las determinaciones, si bien debe hacerse hincapié en que este número está sesgado al alza debido a las extracciones repetidas de un mismo paciente (11 determinaciones correspondían a tan sólo 4 pacientes a los que se les hicieron determinaciones consecutivas), algunas de las muestras nos habían sido expresamente enviadas por presentar resultados no concluyentes en otros centros de diagnóstico y, por último, a que un notable número de reactividades discordantes correspondían a anticuerpos de transferencia materna, remanentes en niños nacidos de madre infectada con *T. cruzi*. Es de destacar el hecho de que una vez confirmadas las discrepancias entre técnicas, la reactividad en una u otra se ha mantenido constante en las tomas sucesivas en un mismo paciente. De acuerdo con ello, la recomendación de realizar una nueva extracción para definir los diagnósticos no concluyentes¹⁴ no parece aportar demasiadas ventajas.

Para discernir entre sueros positivos y negativos en muestras con resultados discordantes mediante las técnicas convencionales, se han propuesto diversas técnicas que utilizan antígenos tales como los antígenos de secreción –excreción del parásito (TESA) usados en ELISA o en inmunoblot¹⁴⁻¹⁷, glicoproteínas de 72 y 90 kDa, detectadas mediante radioinmunoensayo (RIPA)¹⁸, o antígenos recombinantes diversos usados mediante inmunoblot¹⁹. Sin embargo los resultados obtenidos en estos estudios dejan de ser concluyentes y ninguno de los antígenos o sistemas

diagnósticos propuestos ha sido comercializado y/o está al alcance de los centros de diagnóstico habituales.

La especificidad de la técnica desarrollada ha mostrado ser muy alta al ser determinada en donantes de sangre previamente seronegativos mediante dos técnicas serológicas⁵. Sin embargo, y como sucede habitualmente cuando se utilizan antígenos crudos del parásito²⁰, el parentesco antigénico presente entre los tripanosomátidos se ha manifestado con una reactividad, moderada o débil, del suero de pacientes con leishmaniosis visceral al antígeno completo de *T. cruzi*. Es éste un factor que debe tenerse en cuenta cuando se utiliza este tipo de antígenos, fundamentalmente en áreas geográficas donde la leishmaniosis es endémica, tal como ocurre en España.

Las dos técnicas ELISA aplicadas son notablemente distintas en cuanto a su composición antigénica, conjugado enzimático utilizado y a la expresión de los resultados. A pesar de ello al compararlas se observa un elevado grado de concordancia y correlación entre los resultados cualitativos y cuantitativos obtenidos lo cual indica la robustez de ambas técnicas.

Como conclusión final señalamos que la técnica desarrollada reúne los requisitos necesarios que la hacen idónea para ser aplicada en el diagnóstico de confirmación de la enfermedad de Chagas ya que es sensible, específica, de lectura objetiva, de fácil automatización y presenta un bajo coeficiente de variabilidad.

Agradecimientos

Parte del trabajo ha recibido financiación de la Fundación Bayer y de la *Agència d'Avaluació de Tecnologies i Recerca Mèdiques de la Generalitat de Catalunya*. Parte de los kits de diagnóstico utilizados fueron amablemente cedidos por Biokit S.A.

Bibliografía

1. Riera C, Guarro A, El Kassab H, *et al*. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Europe (Spain): a case report. *Am J Trop Med Hyg* 2006;75:1078-81.
2. Muñoz J, Portús M, Corachán M, Fumadó V, Gascon J. Congenital *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic area. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007;101:1161-2.
3. Flores-Chávez M, Fernández B, Puente S, *et al*. Transfusional Chagas Disease: Parasitological and serological monitoring of an infected recipient and blood donor. *Clin Infect Dis* 2008;46:e44-7.
4. Piron M, Vergés M, Muñoz J, *et al*. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in at-risk blood donors in Catalonia (Spain). *Transfusion* 2008;48:1862-8.
5. Muñoz J, Gómez i Prat J, Gállego M, *et al*. Clinical profile of *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic setting immigration and Chagas disease in Barcelona (Spain). *Acta Tropica* (en prensa).

6. WHO. Control of Chagas disease. 2nd report of the WHO Expert Committee. *WHO Technical Report Series* 2002;905:1-109.
7. Gascón J, *et al.* Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas importada. *Med Clin (Barc)*. 2005;125:230-5.
8. Piron M, Fisa R, Casamitjana N, *et al.* Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Tropica* 2007;103:195-200.
9. Oelemann WMR, Teixeira MGM, Peralta JM. Screening and confirmation in Chagas disease serology-A contribution. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94(Suppl 1):307-8.
10. Tobler LH, Contestable P, Pitina L, *et al.* Evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Chagas antibody in US blood donors. *Transfusion* 2007;47:90-6.
11. Gomes ML, Galvao LMC, Macedo AM, Pena SDJ, Chiari E. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic molecular and serologic methods. *Am J Trop Med Hyg* 1999;60:205-10.
12. Castro AM, Luquetti AO, Rassi A, Rassi GG, Chiari E, Galvao LMC. Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 2002;88:894-900.
13. Salomone OA, Basquiera AL, Sembaj A, *et al.* *Trypanosoma cruzi* in persons without serologic evidence of disease, Argentina. *Emerg Infect Dis* (serial online) 2003 Dec. <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol9no12/03-0008.htm>
14. Picka MCM, Meira DA, de Carvalho TB, Peresi E, Marcondes-Machado J. Definition of a diagnostic routine in individuals with inconclusive serology for Chagas disease. *Braz J Infect Dis* 2007;11:226-33.
15. Matsumoto TK, Cotrim PC, da Silveira JF, *et al.* *Trypanosoma cruzi*: isolation of an immunodominant peptide of TESA (Trypomastigote Excreted-Secreted Antigens) by gene cloning. *Microbiol Infect Diagn Dis* 2002;42:187-92.
16. Silveira-Lacerda EP, Silva AG, Junior SF, Souza MA, Kesper N, Botelho-Filho A, Umezawa ES. Chagas' disease: application of TESA-blot in inconclusive sera from a Brazilian blood bank. *Vox Sang* 2004;87:204-7.
17. Berrizbeitia M, Ndao M, Bubis J, *et al.* Purified excreted-secreted antigens from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes as tools for diagnosis of Chagas' disease. *J Clin Microbiol* 2006;44:291-6.
18. Kirchoff LV, Gam AA, Gusmao RA, Goldsmith RS, Rezende JM, Rassi A. Increased specificity of serodiagnosis of Chagas' disease by detection of antibody to the 72- and 90- kilodalton glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. *J Infect Dis* 1987;155:561-4.
19. Cheng KY, Chang CD, Salbilla VA, *et al.* Immunoblot assay using recombinant antigens as a supplemental test to confirm the presence of antibodies to *Trypanosoma cruzi*. *Clin Vacc Immunol* 2007;14:355-61.
20. Caballero ZC, Sousa OE, Marques WP, Saez-Alquezar A, Umezawa ES. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. *Clin Vacc Immunol* 2007;14:1045-9.