

ARTÍCULO ORIGINAL

¿Necesidad de actualización del diagnóstico serológico de enfermedad de Chagas?

Bariandarán, Aldana^{1*}; Batalla, Marcelo¹; Costa, Marina¹; Salama, Florencia¹; Urso, Dolores¹; Buchovsky Ana¹

¹Laboratorio de Serología, Laboratorio Central, Hospital de Pediatría S.A.M.I.C. Prof. Dr. Juan P. Garrahan. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

*Contacto: Bariandarán, Aldana, Hospital de Pediatría S.A.M.I.C. Prof. Dr. Juan P. Garrahan, Combate de los Pozos 1881 (C1245 AAM), Ciudad de Buenos Aires, Argentina; aldibariandarán@gmail.com.

Resumen Introducción: el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en su fase crónica debe realizarse, según los consensos, a través de al menos dos reacciones serológicas de antígeno y fundamentos diferentes debido a la falta de una técnica de referencia. Objetivo: evaluar la potencialidad del inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas (CMIA ARCHITECT Chagas®) como única técnica para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas. Materiales y métodos: se realizó un estudio descriptivo retrospectivo. Se analizaron muestras con los métodos CMIA ARCHITECT Chagas® y Chagatest ELISA lisado (Wiener lab.). Las muestras fueron consideradas positivas cuando ambas pruebas resultaron positivas, negativas con ambos test negativos y discordantes cuando no cumplían estos criterios. Estas últimas fueron analizadas por inmunofluorescencia indirecta "in house" para definir el estado serológico. Resultados: se analizaron 5658 muestras, 99 fueron positivas, 5533 negativas y 26 discordantes, con las técnicas de CMIA y ELISA. No se observaron falsos negativos con CMIA. La media de los resultados por CMIA (S/CO) para los positivos fue de $8,32 \pm 3,13$, la de los negativos, $0,08 \pm 0,11$ y la de los discordantes, $1,41 \pm 0,74$, habiendo una diferencia estadísticamente significativa entre ellas ($p < 0,05$ test de Comparación Múltiple de Bonferroni). Discusión y conclusión: dado que no existieron falsos negativos con CMIA y que no se observó discordancia entre ambas técnicas para las muestras reactivas con un $S/CO \geq 5,00$, se propone para estas últimas y para las muestras no reactivas utilizar como única técnica CMIA, disminuyendo así el tiempo de respuesta.

Palabras claves: enfermedad de Chagas, diagnóstico serológico, CMIA.

Need to update serological diagnosis of Chagas disease?

Abstract Introduction: Chagas disease in its chronic phase should be diagnosed by at least two different serological tests based on different principles and antigens according to consensus due to the lack of a reference technique. Objective: To evaluate the potential of the chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA ARCHITECT Chagas®) as the only technique for the serological diagnosis of Chagas disease. Materials and methods: 5658 samples were studied descriptively retrospectively using CMIA ARCHITECT Chagas® and Chagatest ELISA lysate (Wiener lab.) techniques. The samples were considered positive when both tests were positive, negative if the two tests were negative, and discordant when they did not meet these criteria. The latter were analyzed by a third technique, an "in house" indirect immunofluorescence, to define the serological status. Results: 99 of the 5658 samples were positive, 5533 were negative and 26 were discordant. No false negatives were observed with CMIA. The average S/CO of the CMIA was 8.32 ± 3.13 for the positive samples, 0.08 ± 0.11 for the negative ones and 1.41 ± 0.74 for the discordant ones, with a statistically significant difference between them ($p < 0.05$, Bonferroni's Multiple Comparison Test). Discussion and conclusion: Since there were no false negatives with the CMIA and there was no disagreement between both techniques for the reactive samples with an $S/CO \geq 5.00$, we proposed for the latter and the non-reactive samples to use the CMIA as the only technique, reducing the analysis time.

Keywords: chagas disease, serological diagnosis, CMIA.

Introducción

La enfermedad de Chagas, consecuencia de la infección por el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), es uno de los principales problemas de salud que afecta a la población latinoamericana. *T. cruzi* se transmite por contacto con las heces contaminadas de los insectos vectores (triatóminos), por transfusión sanguínea, de forma congénita, por trasplantes de órganos y, últimamente, se está describiendo un mayor número de casos por transmisión oral [1].

El Ministerio de Salud y Desarrollo Social de la Nación y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) coinciden en sus estimaciones: en Argentina 1.505.235 personas tienen Chagas, lo que equivale a un 4 % del total de la población del país [2].

La infección evoluciona en dos fases: la primera, denominada fase aguda, puede incluir algunos síntomas como fiebre prolongada, diarrea, dolor de cabeza, cansancio, irritabilidad, vómitos, falta de apetito y malestar general, aunque los síntomas no siempre se presentan y en muchos casos pueden llegar a confundirse con un estado gripal. Solo un 1 - 2 % de los casos se detecta en esta fase, en donde el diagnóstico se realiza por métodos parasitológicos, debido a que la parasitemia es elevada. La segunda fase denominada crónica, en la que el 50 - 70 % de las personas infectadas no desarrolla sintomatología, puede durar varios años o toda la vida. La mayoría de las infecciones se diagnostica en esta fase, donde la parasitemia suele ser baja y en ocasiones indetectable; es por eso que los métodos diagnósticos de elección son los basados en la detección de anticuerpos específicos, aunque actualmente no existe una técnica de referencia [3,4]. En esta fase, el diagnóstico de infección por *T. cruzi* se realiza cuando dos pruebas serológicas de distinto fundamento y que utilizan antígenos diferentes son positivas.

En caso de un resultado discordante, es necesario realizar una tercera técnica con otro fundamento o solicitar una nueva muestra para definir el diagnóstico [5,6]. Los estudios serológicos que emplean extractos crudos del parásito como antígeno poseen sensibilidades que varían entre el 95 y el 100 %, mientras que los test más recientes utilizan antígenos y/o péptidos sintéticos de alto grado de pureza y elevada calidad, lo que supone una mejora de la sensibilidad y de la especificidad especialmente importante a la hora de evitar falsos positivos y negativos [7,8].

En el presente trabajo, se evaluó la potencialidad del inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas (CMIA) totalmente automatizado (ARCHITECT Chagas®, Abbott) como única técnica para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas en la rutina asistencial.

Materiales y métodos

Se trata de un estudio descriptivo retrospectivo conducido por el Laboratorio de Serología del Hospital de Pediatría S.A.M.I.C. Prof. Dr. Juan P. Garrahan donde fueron analiza-

das muestras de suero de pacientes pediátricos y adultos (madres de niños en estudio con enfermedad de Chagas) correspondientes al período de enero del 2016 a octubre del 2018. A todas las muestras se les realizó la técnica de CMIA ARCHITECT Chagas®, Abbott, empleando el sistema ARCHITECT i4000SR (Abbott), el cual consiste en un ensayo automatizado que utiliza una mezcla de proteínas FP3, FP6, FP10 y TcF recombinantes como antígeno, que representan 14 regiones antigénicas distintas que, a su vez, abarcan las 3 formas morfológicas del parásito. Como segunda técnica, se les realizó el ensayo Chagatest ELISA lisado (Wiener lab.), un enzimoimmunoensayo en fase sólida que utiliza antígenos de *T. cruzi* de zonas altamente conservadas entre distintas cepas. Ambos permiten la detección cualitativa de anticuerpos IgG anti *T. cruzi*.

Para el ensayo CMIA, los resultados se expresaron como valores de S/CO (cociente de la señal de quimioluminiscencia de la muestra [S] y de la media de los calibradores utilizados en el ensayo [CO]). Radios iguales o menores que 0,80 fueron considerados negativos; mayores o iguales a 1,00, positivos y la zona gris o valor indeterminado correspondió al rango entre 0,80 y 1,00.

En cuanto al ELISA, la presencia o ausencia de anticuerpos anti *T. cruzi* se determinó relacionando la absorbancia de la muestra con respecto al valor del punto de corte (punto de corte = control negativo + 0,200). Muestras mayores o iguales al punto de corte se consideraron positivas y menores que este, negativas. Las muestras fueron consideradas positivas cuando las 2 pruebas resultaron positivas, negativas, si los 2 test eran negativos, y discordantes cuando no cumplían estos criterios. Estas últimas fueron analizadas además por inmunofluorescencia indirecta (IFI) "in house", utilizando el parásito entero como antígeno (brindado por el Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatała Chabén") como tercera técnica. La interpretación final se realizó según el resultado concordante de 2 de las 3 técnicas. Todos los test se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante y el algoritmo propuesto por la Guía para el Diagnóstico y Tratamiento de la enfermedad de Chagas del Ministerio de Salud.

El análisis de datos fue realizado con el programa GraphPad Prism 5 y se utilizó el test de Comparación Múltiple de Bonferroni para evaluar la diferencia entre las medias de las distintas poblaciones, considerando significativo un $p < 0,05$.

Resultados

Con el uso de las técnicas de ELISA y CMIA, del total de las 5658 muestras analizadas, 99 (1,75 %) fueron positivas, 5533 (97,79 %) negativas y 26 (0,46 %) discordantes (Tabla I). Dentro de este último grupo, 21 muestras fueron catalogadas como negativas, ya que al realizarles la IFI, esta resultó negativa. Respecto de las 5 muestras restantes, se solicitó nueva muestra debido a la imposibilidad de arribar a un diagnóstico de certeza.

Tabla I. Resultados obtenidos con los ensayos de CMIA y ELISA para el total de las muestras.

		Resultado CMIA			Total
		Reactivo	Indeterminado	No reactivo	
Resultado ELISA	Reactivo	99	3	3	105
	Indeterminado	3	0	5	8
	No reactivo	12	0	5533	5545
	Total	114	3	5541	5658

► ELISA, enzimoimmunoensayo; CMIA, inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas.

Teniendo en cuenta las muestras discordantes, 10 de las 15 muestras (66,67 %) que fueron reactivas por CMIA y no reactivas/indeterminadas por ELISA correspondieron a niños menores de 10 meses; por ello se asumió que la reactividad del CMIA se debió a la detección de los anticuerpos maternos, dado que las madres estaban infectadas por *T. cruzi*.

En la figura 1, se muestra la distribución de los resultados entre los distintos grupos. Siendo la media de los resultados del CMIA [S/CO] para los positivos de $8,32 \pm 3,13$, la de los negativos $0,08 \pm 0,11$ y la de los discordantes $1,41 \pm 0,74$, se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre ellas [$p < 0,05$ test de Comparación Múltiple de Bonferroni]. No se observaron falsos negativos con la técnica de CMIA. En cuanto a la media del ELISA, para los dis-

cordantes fue de $1,11 \pm 0,83$, muy cercano al punto de corte de la técnica.

Discusión

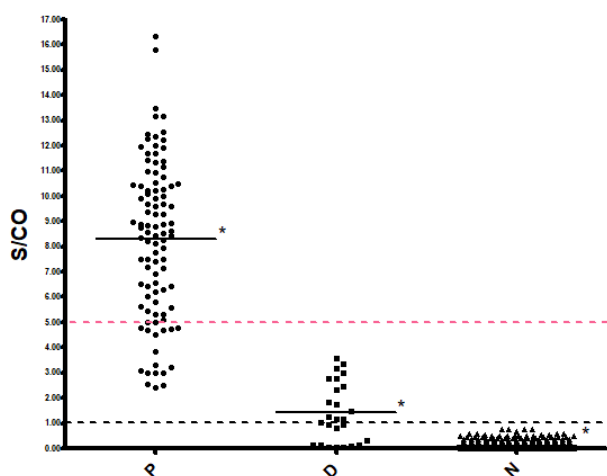
La detección de anticuerpos frente a *T. cruzi* continúa siendo el principal procedimiento para el diagnóstico serológico de enfermedad de Chagas. El inconveniente de este tipo de tests es el amplio rango de sensibilidad y especificidad que presentan, dependiendo del método y del antígeno utilizado. La diversidad antigénica de las proteínas utilizadas en el ensayo de CMIA ARCHITECT Chagas® constituye la base de su elevada sensibilidad (100%) y, además, muestra una clara discriminación entre muestras positivas y negativas, lo que la convierte en una técnica adecuada para diagnóstico [9].

Teniendo en cuenta que con el ensayo CMIA ARCHITECT Chagas® no se observaron falsos negativos y que a valores no cercanos al punto de corte no existen discrepancias entre las técnicas, se propone elevar el punto de corte de la técnica a $S/CO = 5,00$. De esta forma, para aquellas muestras con un $S/CO \geq 5,00$ y para las no reactivas, no sería necesario realizar una segunda técnica: únicamente el ensayo de CMIA resultaría suficiente para confirmar o descartar el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas. Sin embargo, en aquellas muestras positivas con resultados cercanos al punto de corte [$S/CO = 1,00 - 5,00$], sería recomendable continuar realizando ambas técnicas.

Es necesario tener en cuenta que siempre, al momento de validar un resultado, y más en aquellos casos discordantes, la clínica y epidemiología del paciente son herramientas fundamentales.

Hasta hace algún tiempo, la infección por *T. cruzi* era considerada un problema de salud estrictamente latinoamericano, ya que su presencia se vinculaba con la distribución y densidad de varias especies de vinchucas en las zonas endémicas. Actualmente, se encuentran millones de casos de Chagas en todo el mundo, en parte debido a las migraciones humanas; es por eso que otros autores de Europa plantean un algoritmo similar y también proponen subir el umbral de

Figura 1. Distribución de los niveles de anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi* en los distintos grupos con la técnica de CMIA.



► La línea horizontal dentro de cada grupo indica la media aritmética. La línea horizontal discontinua a 1,00 marca el umbral de reactividad. La línea horizontal discontinua a 5,00 marca el umbral propuesto; P, positivos; N, negativas; D, discordantes; CMIA, inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas.

reactividad de la técnica de CMIA de forma que se pueda utilizar como único ensayo diagnóstico [10-13].

Si bien estos primeros resultados son alentadores y señalan un camino de análisis que resulta muy interesante ahondar para lograr una mayor eficiencia en el diagnóstico de esta enfermedad, creemos que un estudio multicéntrico prospectivo sería necesario para evaluar la utilidad y aplicabilidad de esta nueva estrategia diagnóstica.

Este nuevo algoritmo de trabajo permitiría evitar el empleo de una segunda técnica para el diagnóstico de la mayoría de las muestras (99,27 %), de forma que se reducirían los tiempos de análisis, ya que al ser el ELISA una técnica manual, resulta laboriosa y requiere un consumo de tiempo considerable. Como el CMIA ARCHITECT Chagas® es un test automatizado, agiliza los tiempos de diagnóstico y brinda un mayor número de resultados en una menor cantidad de tiempo. Además, la completa automatización reduce los errores humanos y, al trabajar directamente con el tubo primario, asegura la trazabilidad de la muestra e impacta positivamente en la seguridad del paciente.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Referencias bibliográficas

- [1]. World Health Organization. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Wkly Epidemiol Rec* 2015; 90:33-44
- [2]. Organización Panamericana de la Salud. Guía para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Washington, D.C.: OPS; 2018.
- [3]. Flores-Chávez M, de Fuentes I, Gárate T, Cañavate C. Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas importada. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007;25(3):29-37.
- [4]. Bern C. Chagas' disease. *N Engl J Med* 2015; 373:456-466.
- [5]. World Health Organization. Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee. *World Health Organ Tech Rep Ser* 2002; 905:1-109.
- [6]. Afonso AM, Ebell MH, Tarleton RL. A Systematic Review of High Quality Diagnostic Tests for Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(11):e1881
- [7]. Umezawa ES, Bastos SF, Coura JR, Levin MJ, González R, Rangel-Aldao R, et al. An improved serodiagnostic test for Chagas' disease employing a mixture of *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. *Transfusion*. 2003;43:91-7
- [8]. Umezawa ES, Luquetti AO, Levitus G, Ponce C, Ponce E, Henríquez D, et al. Serodiagnostic of chronic and acute Chagas' disease with *Trypanosoma cruzi* recombinant proteins: results of a collaborative study in six Latin American countries. *J Clin Microbiol*. 2004;42:449-52
- [9]. Iborra-Bendicho MA, Albert-Hernández M, Márquez-Contreras C, Segovia-Hernández M, et al. ARCHITECT Chagas®: una nueva herramienta diagnóstica en la enfermedad de Chagas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30:463-465
- [10]. Sanmartino M, Avaria A, Gómez i Prat J, Parada MC, Albajar-Viñas P. D. Que no tengan miedo de nosotros: el Chagas según los propios protagonistas. *Interface (Botucatu)*. 2015;19(55):1063-75
- [11]. Gascón J, Bern C, Pinazo MJ. Chagas diseases in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop*. 2010;115(1-2):22-7
- [12]. Abras A, Gállego M, Llovet T, Tebar S, Herrero M, Berenguer P, et al. Serological diagnosis of chronic Chagas disease: Is it time for a change? *J Clin Microbiol*. 2016 JCM. 00142-16
- [13]. Perez-Ayala A, Fradejas I, Rebollo L, Lora-Pablos D, Lizasoain M, Herrero-Martinez JM, et al. Usefulness of the ARCHITECT Chagas® assay as a single test for the diagnosis of chronic Chagas disease. *Trop Med IntHealth*. 2018; 23(6): 634-640