

## Artículo original

# Comparación de siete pruebas diagnósticas para detectar infección por *Trypanosoma cruzi* en pacientes en fase crónica de la enfermedad de Chagas

Comparison of seven diagnostic tests to detect *Trypanosoma cruzi* infection in patients in chronic phase of Chagas disease

Luisa Fernanda Duarte<sup>1</sup>, Oscar Flórez<sup>1</sup>, Giovanna Rincón<sup>1</sup>, Clara Isabel González\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Molecular Immunology and Epidemiology Group, GIEM, Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

Luisa Fernanda Duarte, Oscar Flórez, Giovanna Rincón, Clara Isabel González. Comparison of seven diagnostic tests to detect *Trypanosoma cruzi* infection in patients in chronic phase of Chagas disease. *Colomb Med.* 2014; 45(2): 61-66.

© 2014 Universidad del Valle. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution License, que permite el uso ilimitado, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que el autor original y la fuente se acrediten.

### Historia:

Recibido: 18 junio 2013  
Revisado: 23 junio 2014  
Aceptado: 26 junio 2014

### Palabras clave:

Enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, ensayo de inmunoadsorción enzimática, diagnóstico, proteínas recombinantes, reacción en cadena de la polimerasa, Colombia.

### Keywords:

Chagas disease; *Trypanosoma cruzi*, enzyme linked immunosorbent assay, diagnosis, recombinant proteins, polymerase chain reaction, Colombia.

### Resumen

**Objetivo:** Comparar la capacidad diagnóstica de siete métodos para determinar infección por *Trypanosoma cruzi*, en pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

**Métodos:** Estudio analítico de casos y controles, que incluyó 205 personas (pacientes con miocardiopatía chagásica, n= 100; grupo control, n= 105). Se evaluaron tres inmunoensayos enzimáticos, una hemaglutinación indirecta y una inmunocromatografía. Adicionalmente, se realizó amplificación de ADN de *T. cruzi* por reacción en cadena de la polimerasa utilizando como secuencias diana ADN de kinetoplasto y nuclear. Para el análisis comparativo de las pruebas diagnósticas, los parámetros utilizados fueron sensibilidad, especificidad, valores predictivo positivo y negativo, análisis ROC, razón de verosimilitud positiva y negativa, así como análisis de calidad  $\kappa$ .

**Resultados:** La prueba Bioelisa para Chagas mostró la mayor sensibilidad (98%), especificidad (100%) y valores predictivos positivo y negativo; además ésta tuvo el mayor poder discriminatorio. En contraste, los ensayos de amplificación de ADN de *T. cruzi* mostraron baja sensibilidad (ADN de kinetoplasto= 51%, ADN nuclear= 22%), alta especificidad (100%) y de moderada a baja capacidad discriminatoria.

**Conclusión:** El análisis comparativo entre los métodos sugiere utilizar como estrategia diagnóstica en pacientes crónicos con enfermedad de Chagas, los ensayos de ELISA con proteínas recombinantes y/o péptidos sintéticos por mostrar un rendimiento diagnóstico superior y tener la capacidad de confirmar y descartar el diagnóstico de infección por *T. cruzi*. Los métodos moleculares muestran pobre rendimiento para ser utilizados en el diagnóstico de pacientes en fase crónica con enfermedad de Chagas.

### Abstract

**Objective:** To compare the diagnostic performance of seven methods to determine *Trypanosoma cruzi* infection in patients with chronic Chagas disease.

**Methods:** Analytical study, using the case-control design, which included 205 people (patients with Chagasic cardiomyopathy, n= 100; control group, n= 105). Three enzyme linked immunosorbent assays, one indirect hemagglutination assay and one immunochromatographic test were assessed. Additionally, DNA amplification was performed via the PCR method using kinetoplast and nuclear DNA as target sequences. For the comparative analysis of diagnostic tests, the parameters used were sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, Receiver Operator Characteristic (ROC), positive and negative likelihood ratio, as well as  $\kappa$  quality analysis.

**Results:** The commercial Bioelisa Chagas test showed the highest sensitivity (98%), specificity (100%), and positive and negative predictive values; additionally it had the highest discriminatory power. Otherwise, the amplification of *T. cruzi* DNA in blood samples showed low values of sensitivity (kinetoplast DNA= 51%, nuclear DNA= 22%), but high values of specificity (100%), and moderate to low discriminatory ability.

**Conclusion:** The comparative analysis among the different methods suggests that the diagnostic strategy of *T. cruzi* infection in patients with chronic Chagas disease can be performed using ELISA assays based on recombinant proteins and/or synthetic peptides, which show higher diagnosis performance and can confirm and exclude the diagnosis of *T. cruzi* infection. The molecular methods show poor performance when used in the diagnosis of patients with chronic Chagas disease.

### \*Autor de correspondencia:

Clara Isabel González Rugeles, PhD Escuela de Bacteriología, Facultad de Salud  
Carrera 32 # 29-31, Oficina 419 Bucaramanga, Colombia  
Tel: +57 7 6322429 Fax: +57 7 6322429. E-mail: oc.ude.siu@gic

## Introducción

La enfermedad de Chagas (EC) es causada por la infección con el parásito protozoario intracelular *Trypanosoma cruzi*. La Organización Mundial de la Salud estima que aproximadamente 8 millones de personas en Latinoamérica están infectadas<sup>1</sup>. Sin embargo, debido a la creciente migración de latinoamericanos a múltiples países en todo el mundo, esta patología ahora debe ser considerada una enfermedad global<sup>2</sup>. En Colombia, la prevalencia de infección por *T. cruzi* es de alrededor del 5%, correspondiente a 700,000 personas<sup>3</sup>, y, en algunas áreas del departamento de Santander, la seroprevalencia es de cerca del 50%<sup>4</sup>. Las manifestaciones clínicas de la EC incluyen una fase aguda y una crónica, la cual se presenta con un amplio espectro de manifestaciones con formas cardíacas, digestivas y neurológicas. Sin embargo, sólo aproximadamente entre un 20-30% de los individuos infectados desarrolla la cardiomiopatía chagásica crónica y/o el megaesófago/megacolon<sup>2</sup>.

El diagnóstico de infección con *T. cruzi* es complejo, especialmente durante la fase crónica, debido a la ausencia de síntomas y a la parasitemia baja o intermitente<sup>2</sup> que hace que los métodos parasitológicos directos tengan baja sensibilidad. Por esta razón, el diagnóstico se basa en métodos serológicos, los cuales detectan la presencia de anticuerpos específicos dirigidos contra antígenos de *T. cruzi* combinados con hallazgos clínicos y epidemiológicos. Sin embargo, las pruebas serológicas presentan alta sensibilidad, pero poca especificidad por reacciones cruzadas con otros parásitos como *Leishmania* sp. y *T. rangeli*<sup>5</sup>. En este escenario, la Organización Panamericana de Salud (OPS) sugirió que por lo menos dos ensayos basados en diferentes técnicas deberían ser usados en paralelo para aumentar la precisión diagnóstica porque un solo ensayo no es considerado lo suficientemente sensible y específico<sup>6</sup>. Pero esta estrategia ha llevado a un aumento en el número de resultados inconclusos que dificultan el manejo clínico de estos casos. Además, el diagnóstico correcto no sólo es una prioridad para identificar a los individuos que deben recibir un tratamiento adecuado, sino, también, para reducir y prevenir el riesgo de transmisión a través de transfusiones de sangre y/o trasplante de órganos.

Los métodos inmunológicos se basan en el ensayo inmunoenzimático (Elisa), ensayo de hemaglutinación indirecta (HAI), inmunofluorescencia indirecta (IFI), ensayo de inmunotransferencia (IB) y ensayo inmunocromatográfico (IC). La mayoría de los ensayos usan como antígeno lisados crudos del parásito; sin embargo, se ha descrito el uso de proteínas recombinantes y/o péptidos sintéticos para aumentar la especificidad de las pruebas<sup>7-9</sup>. A pesar de que los métodos inmunológicos se usan en el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*, los métodos moleculares proporcionan una alternativa, especialmente en casos de serología dudosa<sup>10, 11</sup>. Estos métodos están basados, principalmente, en la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Sin embargo, el ensayo de PCR anidada (PCR-A)<sup>10</sup>, el ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real (PCR-RTQ)<sup>11</sup>, y el ensayo de oligocromatografía (OligoC)<sup>12</sup> se han realizado para mejorar la detección de ADN de *T. cruzi*. Dada la heterogeneidad de los resultados reportados de las pruebas disponibles para el diagnóstico, el objetivo de este estudio fue comparar la precisión de los métodos serológicos y moleculares para detectar la infección por *T. cruzi* en pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

## Materiales y Métodos

### Población y muestras del estudio

El estudio es analítico con diseño de casos y controles, que incluyó un

total de 205 personas. En el estudio, los individuos fueron seleccionados de una base de datos de aproximadamente 2,000 pacientes que habían sido reclutados para un estudio de epidemiología molecular de la EC, realizado por nuestro grupo de investigación durante los últimos 10 años. La base de datos cuenta con datos epidemiológicos, clínicos, de laboratorio y la información de cada participante. La recolección de los datos epidemiológicos se llevó a cabo cara a cara por entrevistadores entrenados con independencia del personal médico que elaboró el cuestionario. El diagnóstico clínico fue establecido por consenso por un panel independiente formado por dos médicos cardiólogos. Con el fin de conocer el valor diagnóstico de cada prueba serológica y molecular para la detección de *T. cruzi* y porque no existe una prueba estándar de oro para el diagnóstico de la EC, la selección de los individuos se realizó mediante la combinación de características epidemiológicas y clínicas. Por lo tanto, los criterios de inclusión para el grupo de los pacientes con miocardiopatía chagásica (n= 100) fueron personas de zonas rurales en las que el nivel de endemidad es elevado, con cardiomiopatía claramente compatible con EC por electrocardiograma, ecocardiograma y Holter de 24 h; mientras que las personas sin signos y síntomas cardíacos y provenientes de una zona urbana no endémica conformaron el grupo control (n= 105). Además, todas las personas vivieron en estas áreas por 10 o más años. La recolección de las muestras fue así: a cada persona se le tomaron tres muestras de sangre; una de éstas (6 mL) se utilizó para obtener suero y las otras dos (4 mL cada una y con anticoagulante EDTA) para aislar el ADN genómico a partir de la capa leucocitaria. El tiempo y temperatura de almacenamiento entre la recolección de la sangre y la extracción de ADN fue de 48 h a 4° C. Las muestras de suero y de ADN se almacenaron por congelación a -70 y -20° C, respectivamente, hasta la realización del ensayo. Estas muestras se utilizaron para evaluar el rendimiento diagnóstico de los métodos serológicos y moleculares para detectar la infección por *T. cruzi*. Las pruebas de laboratorio fueron realizadas por dos profesionales expertos en Microbiología, quienes no conocían la información de los individuos. Dos investigadores, que tampoco conocían la información de los individuos, revisaron los resultados de las pruebas de laboratorio. Los miembros del panel revisaron individualmente cada prueba de laboratorio antes de reunirse para acordar un resultado final. Todas las pruebas de laboratorio fueron asignadas correctamente, con 100% de concordancia entre los miembros del panel.

### Métodos serológicos

Los anticuerpos anti-*T. cruzi* en suero fueron determinados mediante Elisa casero y recombinante, HAI y las pruebas de IC.

El Elisa casero se realizó en placas de microtitulación de 96 pocillos (Dynatech sistema micro Elisa; Alemania) con extracto soluble de epimastigotes de una cepa autóctona de *T. cruzi* I (MHOM/CO/06/338). Las placas se recubrieron con 100 µL de 2.0 µg mL<sup>-1</sup> de antígeno diluido en tampón de carbonato-bicarbonato, pH 9.6, por pocillo y se incubaron durante la noche a 4° C. Después las placas se lavaron con Tween 20 (0.05%) en solución salina tamponada con fosfato (137 mM de NaCl, 2.68 mM de KCl, 1.47 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, y 9.03 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O), pH 7.4 (PBS-T20). Las placas se bloquearon con 2% de leche descremada en PBS-T20. Cada muestra fue probada en duplicado con 100 µL de suero diluido 1:800 en PBS-T20. Las placas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente y se lavaron de nuevo. Posteriormente, se añadieron 100 µL de conjugado de anti-inmunoglobulina humana polivalente (α, γ y μ específica) marcada con fosfatasa alcalina: Cat. no. A3313 (Sigma-Aldrich, Inc.; EE.UU.), diluido 1:6,000 en PBS-T20. Las placas se incubaron durante 1 h a 37° C y nuevamente fueron lavadas. Después de la incubación y el lavado, se añadieron 100 µL de 1 mg mL<sup>-1</sup> de

p-nitrofenil fosfato (Sigma-Aldrich, Inc.; EE.UU.) preparado en tampón de dietanolamina al 10%, pH 9.7. Las placas se incubaron durante 25 min a temperatura ambiente. Finalmente, se detuvo la reacción con 50 µL de 3 M de NaOH. La densidad óptica (DO) a 410 nm se midió en un lector de microplacas modelo MR550 (Bio-Rad Laboratories, Inc.; EE.UU.). Una muestra se consideró positiva si la DO fue igual o superior a 0.37. Este punto de corte se estimó con base en el análisis de la curva ROC. El punto de corte óptimo se definió como el valor que maximiza el área bajo la curva ROC (Fig. 1A).

Todas las muestras se ensayaron también por BioELISA Chagas (Biokit; España), que utilizó como antígeno péptidos sintéticos TcD, TcE, PEP2 y TCL11-2 y por Chagatest ELISA recombinante V.3.0 (Winer laboratorio; Argentina), que utilizó como antígeno las proteínas recombinantes Ag1, Ag2, Ag13, Ag30, Ag36, y SAPA. Otras pruebas usadas fueron: Chagatest HAI (Winer Lab; Argentina.), que utilizó como antígeno eritrocitos de oveja sensibilizados con lisado de parásitos y la prueba de IC, que incluyó, como antígeno, los antígenos recombinantes H49 y 1F8 (Chagas AB rapid, Standard Diagnostics; Corea). Todas las determinaciones de los kits comerciales se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

**Métodos moleculares**

El ADN genómico se aisló mediante el método de “salting-out” a partir de la capa de leucocitos tomados de los 4 mL de sangre anticoagulada con EDTA<sup>13</sup>. El ADN nuclear y del kinetoplasto de *T. cruzi* fueron amplificados mediante el método de PCR con el termociclador PTC-200 \* Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc.; EE.UU.). El límite de detección del ADN de *T. cruzi* para los protocolos de PCR optimizados se estimó en 10 parásitos por 100 µg µL<sup>-1</sup> de ADN total aislado. Esta concentración se determinó mediante la mezcla de muestras de sangre anticoagulada con EDTA de una persona sana (no infectada por *T. cruzi*) con 1 mL de epimastigotes de *T. cruzi* I. Las mezclas ensayadas fueron: 1,000, 100, 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 parásitos en 4 mL de sangre total. El ADN genómico se aisló de la capa leucocitaria, como se mencionó anteriormente y diferentes concentraciones de ADN se probaron en cada ensayo de PCR. Los experimentos se realizaron por triplicado en tres ocasiones independientes.

La secuencia de ADN nuclear (ADNn) de *T. cruzi* repetida en “tándem” fue amplificada utilizando los cebadores Tcz1 (5'-CGA GCT CTT GCC CAC ACG GGT GCT-3 ') y Tcz2 (5'-CCT CCA AGC AGC GGA TTC

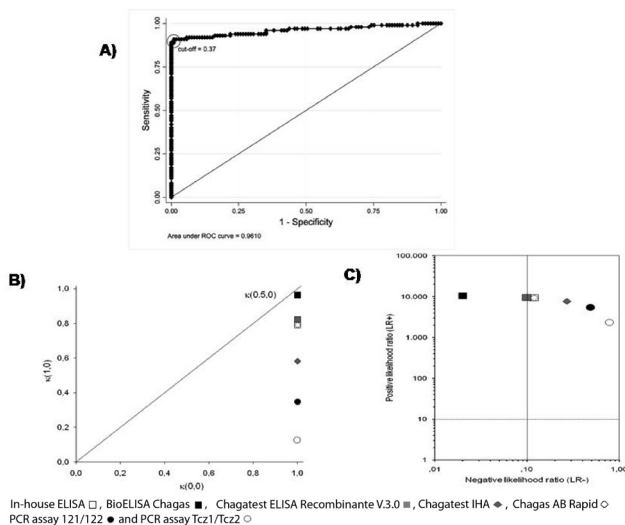
TAG AGG-3 ') que amplificaron un fragmento de 188 pb ~ durante 30 ciclos (94° C por 30 s, 55° C por 30 s, 72° C por 30 s). Cada PCR contenía 0.5 M de cada cebador, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 mM de dNTPs, 1X tampón de Taq y 1 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen Brasil Ltda., Brasil). La región variable del ADN del minicirculo del kinetoplasto (kDNA) fue amplificada por los cebadores 121 (5'-AAA TAA TGT ACG GGK GAG ATG CAT GA-3 ') y 122 (5'-GGT TCG ATT GGG GTT GGT GTA ATA TA-3 ') que amplificaron un fragmento de 330 pb ~ durante 35 ciclos (94° C por 1 min, 63.5° C por 1 min, 72° C por 1 min). Cada reacción contenía 0.5 M de cada cebador, 4.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 mM de dNTPs, 1X tampón de Taq y 1.25 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen Brasil Ltda., Brasil). Las condiciones de amplificación de las PCR se llevaron a cabo con 800 ng de ADN molde en un volumen total de 20 µL. Los productos de la PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio en tampón TAE 1X. Cada amplicón fue reconocido de acuerdo con su tamaño, comparado con el marcador de peso molecular XIV (Roche Applied Science; EE.UU.). Todas las etapas de extracción de ADN y las mezclas de reacción usadas para los ensayos de PCR se controlaron y se compararon con controles positivos y negativos; los controles positivos incluyeron ADN aislado de la cepa de *T. cruzi* Silvio X-10 y el ADN aislado de la sangre infectada con dos cepas de *T. cruzi* I (MHOM/CO/07/REM y MHOM/CO/07/338); mientras que los controles negativos incluyeron ADN aislado de *T. rangeli*, *Leishmania panamensis*, *Toxoplasma gondii*, *Crithidia lucillae* y ADN aislado de la sangre no infectada con *T. cruzi*.

**Consideraciones éticas**

Este estudio cumplió con las leyes colombianas actuales y con los criterios exigidos por el Código de Ética Médica y la declaración de Helsinki. El Comité de Ética de la Universidad Industrial de Santander aprobó este estudio y todos los participantes firmaron el consentimiento informado.

**Análisis de datos**

Para todos los kits comerciales, cada valor de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) y ROC, así como los intervalos de confianza se calcularon con los valores de corte recomendados por los fabricantes. Del mismo modo, se estimaron los LR + y LR-, así como la calidad de la sensibilidad (κ(1,0)), especificidad (κ(0,0)), y eficiencia (κ(0.5, 0))<sup>14,15</sup>. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el uso de la versión de software Stata 10 (Stata Corp, College Station, Texas, EE.UU.).



**Figura 1.** Análisis de las pruebas diagnósticas para detectar infección por *Trypanosoma cruzi* en pacientes con enfermedad de Chagas crónica. **A)** Curva ROC del ELISA casero. Muestra el análisis de sensibilidad y especificidad en diferentes puntos de corte del ELISA casero comparado con el diagnóstico de la enfermedad de Chagas por hallazgos clínicos (electrocardiograma, ecocardiograma y Holter de 24 h), evaluación epidemiológica y hallazgos de laboratorio. **B)** La calidad de la sensibilidad, la especificidad y la eficiencia de cada uno de las pruebas de diagnóstico serológicas y moleculares. Lo óptimo sería una prueba con los valores en la parte superior derecha y en diagonal. κ(1,0) = calidad de la sensibilidad, κ(0,0) = calidad de la especificidad, κ(0,5,0) = calidad de la eficiencia. **C)** Razón de verosimilitud positiva (LR+) y negativa (LR-) de cada prueba diagnóstica serológica y molecular. Prueba en el cuadrante superior derecho solamente confirma el diagnóstico y en el cuadrante inferior izquierdo solamente excluye el diagnóstico. Lo óptimo sería una prueba en el cuadrante superior izquierdo porque confirma y excluye el diagnóstico.

## Resultados

Este estudio se realizó entre junio de 2010 y julio de 2011. La encuesta epidemiológica, diagnóstico clínico y recolección de muestras, fueron adelantadas desde 2001. La estandarización de las pruebas de laboratorio utilizadas en el estudio se realizó entre agosto de 2010 a noviembre de 2010 y las pruebas de laboratorio se llevaron a cabo entre diciembre de 2010 a marzo de 2011. Las características clínicas y demográficas de la población de estudio son: el grupo de casos estuvo compuesto por 100 pacientes con miocardiopatía chagásica, 47 mujeres y 53 hombres, con promedio de edad de  $50.6 \pm 6.4$  años; el grupo de control estuvo compuesto por 105 sujetos sanos, 63 mujeres y 42 hombres, con promedio de edad de  $23.7 \pm 3.3$  años. Todos los participantes seleccionados cumplieron los criterios de inclusión en el estudio.

Las probabilidades condicionales y no condicionales de cada prueba serológica y molecular, así como el análisis de calidad se listan en la Tabla 1. De todas las pruebas realizadas en este estudio, BioELISA Chagas mostró los valores más altos de sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y capacidad discriminatoria (Tabla 1 y Fig. 1B). Por el contrario, los ensayos de PCR para detectar el ADN de *T. cruzi* en muestras de sangre mostraron bajos valores de sensibilidad, pero altos valores de especificidad; sin embargo, mostraron de moderada a baja capacidad discriminatoria (Tabla 1 y Fig. 1B). Además, el análisis de correlación entre los métodos serológicos fue mayor que el de los métodos moleculares, que fue de moderado a bajo (Tabla 2).

Además, el análisis de LR + y LR- mostraron que el BioELISA Chagas

y Chagatest ELISA recombinante V.3.0 pueden confirmar y excluir el diagnóstico de EC; mientras que, Chagatest HAI, Chagas AB rapid y el ELISA casero, así como los ensayos de PCR realizados con el cebador Tcz1/Tcz2 y 121/122, sólo pueden confirmar el diagnóstico de EC (Fig. 1C).

## Discusión

En la fase crónica de la EC el diagnóstico se basa en la presencia de anticuerpos contra *T. cruzi* debido a la ausencia o baja parasitemia; por lo tanto, comúnmente se utilizan pruebas serológicas como ELISA, IFI y HAI. Con el fin de resolver los inconvenientes de resultados falsos negativos y falsos positivos con las pruebas serológicas convencionales, se han desarrollado ensayos serológicos no convencionales con proteínas recombinantes de *T. cruzi*, las cuales tienen valores de sensibilidad y especificidad cercanos al 100%<sup>7-9,16</sup>. A pesar de estos avances, y dado que actualmente no hay disponible ninguna prueba de referencia, la OPS recomienda el uso de dos pruebas basadas en diferentes principios para detectar antígenos<sup>6</sup>. Sin embargo, esta recomendación ha incrementado los resultados discordantes y las dificultades en el diagnóstico. Además, existen numerosas pruebas disponibles en el mercado, pero con una significativa heterogeneidad relacionada con su exactitud, lo cual dificulta la selección de la más adecuada para garantizar el diagnóstico en zonas endémicas.

La evidencia experimental de este estudio muestra que BioELISA Chagas y Chagatest ELISA recombinante V 3.0 presentaron los valores más altos de sensibilidad y especificidad, así como VPP y VPN. Además, tienen una buena capacidad discriminatoria y alta calidad de la sensibilidad

**Tabla 1.** Resultados diagnósticos y rendimiento de las pruebas serológicas y moleculares

Prueba	Prevalencia*	Nivel de la prueba†	Sensibilidad (95% IC)	Especificidad (95% IC)	VPP (95% IC)	VPN (95% IC)	Área ROC (95% IC)	k(1,0)	k(0,0)	k(0.5,0)	LR+	LR-
Serológicas												
ELISA casero	0.49	0.43	0.93 (0.86-0.97)	1.00 (0.97-1.00)	1.00 (0.96-1.00)	0.94 (0.88-0.98)	0.96 (0.93-0.99)	0.79	1	0.88	9240.9	0.12
BioELISA Chagas	0.49	0.48	0.98 (0.93-0.99)	1.00 (0.97-1.00)	1.00 (0.96-1.00)	0.98 (0.93-1.00)	0.99 (0.98-1.00)	0.96	1	0.98	10291.0	0.02
Chagatest ELISA	0.49	0.44	0.99 (0.82-0.95)	1.00 (0.97-1.00)	1.00 (0.96-1.00)	0.91 (0.85-0.96)	0.95 (0.92-0.98)	0.82	1	0.90	9450.9	0.10
Chagatest HAI	0.49	0.36	0.73 (0.63-0.81)	1.00 (0.97-1.00)	1.00 (0.95-1.00)	0.80 (0.72-0.86)	0.87 (0.82-0.91)	0.58	1	0.74	7665.7	0.27
Chagas AB rapid	0.49	0.43	0.88 (0.80-0.94)	1.00 (0.97-1.00)	1.00 (0.96-1.00)	0.90 (0.83-0.95)	0.94 (0.91-0.97)	0.79	1	0.88	9240.9	0.12
Moleculares												
RCP ADNk	0.49	0.25	0.51 (0.41-0.61)	1.00 (0.97-1.00)	1.00 (0.93-1.00)	0.68 (0.60-0.75)	0.75 (0.71-0.80)	0.35	1	0.52	5355.5	0.49
RCP ADNn	0.49	0.11	0.22 (0.14-0.31)	1.00 (0.97-1.00)	1.00 (0.85-1.00)	0.57 (0.50-0.65)	0.61 (0.57-0.65)	0.13	0.99	0.22	2310.2	0.78

\*Prevalencia: total de diagnósticos positivos por muestra. † Nivel de la prueba: total de pruebas positivas por muestra. Los valores calculados con los resultados de cada prueba serológica y molecular de acuerdo con la clínica (electrocardiograma, ecocardiograma y Holter de 24 h) y la evaluación epidemiológica. VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo, LR +: razón de probabilidad positivo, LR-: razón de probabilidad negativa,  $\kappa(1.0)$ : calidad de la sensibilidad,  $\kappa(0.0)$ : calidad de la especificidad,  $\kappa(0.5, 0)$ : calidad de la eficiencia, área ROC: característica operativa del receptor e IC del 95%: intervalo de confianza del 95%.\*

**Tabla 2.** Correlación del diagnóstico de las pruebas serológicas y moleculares

Prueba	Elisa Casero	BioELISA Chagas	Chagatest ELISA	Chagatest HAI	Chagas AB rapid	CRP kADN	RCP ADNn
<b>Serológicas</b>							
Elisa casero	1						
BioELISA Chagas	0.91	1					
Chagatest Elisa	0.96	0.92	1				
Chagatest HAI	0.82	0.78	0.84	1			
Chagas AB rapid	0.94	0.91	0.98	0.84	1		
<b>Moleculares</b>							
RCP ADNk	0.48	0.58	0.49	0.42	0.48	1	
RCP ADNn	0.21	0.33	0.20	0.20	0.17	0.60	1

Valores calculados con los resultados de cada prueba serológica y molecular.

y la especificidad; además de la capacidad para confirmar y excluir el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* en pacientes en fase crónica de la EC (Tabla 1 y Figs. 1B y C). Sin embargo, a pesar de que el nivel de correlación es alto (Tabla 2), los resultados obtenidos mediante el uso de BioELISA Chagas fueron mejores que con Chagatest ELISA recombinante v. 3.0, como ha sido reportado en estudios previos en Colombia en los que este último mostró 95% de sensibilidad<sup>17</sup>. Esto podría ser explicado por diferencias en la composición y mezcla de péptidos sintéticos o proteínas recombinantes de *T. cruzi*. Así, el BioELISA Chagas incluye los péptidos sintéticos TcD, TcE, PEP2 y TCLi1-2 (www.biokit.com), con el modelo de epítopes antigénicos inmunodominantes de *T. cruzi*<sup>18</sup>; mientras que, Chagatest ELISA recombinante v.3.0 incluye las proteínas recombinantes Ag1, Ag2, Ag13, Ag30, Ag36, y SAPA (www.wiener-lab.com.ar). Las características de sensibilidad y especificidad de cada péptido/proteína y sus mezclas fueron revisados previamente por Jose Franco da Silveira<sup>9</sup>. Sin embargo, es importante señalar que ambas pruebas muestran altos niveles de correlación entre sí; por otra parte, exhiben antígenos reconocidos principalmente por anticuerpos de la clase de IgM, tales como TCLi1-2 y SAPA. Sin embargo, en la reacción antígeno-anticuerpo en la prueba Bioelisa Chagas se identifican anticuerpos de la clase de IgG e IgM humana, mientras que el Chagatest ELISA recombinante v.3.0 sólo identifica IgG humana. Por el contrario, el ensayo inmunocromatográfico de Chagas AB rapid es una prueba diagnóstica rápida que utiliza los antígenos recombinantes H49 y 1F8 que han demostrado valores de sensibilidad y especificidad de 97-100%<sup>16,19</sup>. Esta evidencia puede explicar los buenos resultados obtenidos en sensibilidad, especificidad, VPP, VPN, calidad de la sensibilidad, calidad de la especificidad y la capacidad discriminatoria (Tabla 1). Además, su simplicidad y facilidad de interpretación hacen que sea muy útil en el diagnóstico rápido de infección por *T. cruzi* en estudios de campo. Sin embargo, para los sujetos con resultados negativos sería necesario el uso de cualquiera de las otras pruebas para realizar el diagnóstico de infección por *T. cruzi* (Tabla 2). Por otro lado, el ELISA casero y la HAI exhiben altos valores de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN. Sin embargo, el ELISA casero tiene mejores valores de sensibilidad y VPN que el Chagatest HAI, mientras Chagatest HAI tiene mejores valores de especificidad y VPP que el ELISA casero (Tabla 1); además, el ELISA casero presentó mayor capacidad discriminatoria y capacidad para confirmar y descartar el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* (Tabla 1 y Figs. 1B y C). Estas pruebas mostraron falsos positivos y negativos, lo cual podría ser resuelto o mejorarse con el uso de las preparaciones antigénicas de tripomastigotes y/o amastigotes de cepas autóctonas de *T. cruzi*.

La detección de *T. cruzi* en muestras de sangre humana mediante amplificación de ADN con métodos basados en PCR ha sido aplicado para diagnosticar EC en pacientes, quienes han progresado a la fase crónica. Pero, dado que durante esta fase el número de parásitos que circula en sangre periférica es bajo o intermitente, los métodos basados en la PCR

tienen sensibilidades del orden de 45-65%, mientras que la especificidad se mantiene cerca del 100%<sup>5,20,21</sup>. Aunque las secuencias diana utilizadas en este estudio tienen un alto número de copias en el genoma de *T. cruzi* (5,000 a 10,000 copias de ADNk y ~ 10% de ADNn por parásito)<sup>22,23</sup>, los resultados mostraron moderados a bajos valores de sensibilidad y calidad de sensibilidad para ensayos de PCR realizadas con los cebadores 121/122 y Tcz1/Tcz2 (Tabla 1 y Fig. 1B). Estos resultados se podrían explicar, al menos en parte, por la disponibilidad de ADN molde en la mezcla de reacción, que podría estar relacionada con el tipo de cepa de *T. cruzi*. Así, se observan diferencias en el número de copias de ADN satélite blanco, entre las cepas de *T. cruzi* que son más abundantes en *T. cruzi* II que en *T. cruzi* I<sup>24</sup>, así como hay diferencias en el nivel de parasitemia, que es mayor en infección por *T. cruzi* I comparada con *T. cruzi* II<sup>20</sup>. Estos resultados son relevantes porque en Colombia *T. cruzi* I es el grupo predominante, tanto en el ciclo doméstico como selvático, pero hay evidencia de infección por *T. cruzi* II en pacientes con cardiopatía chagásica<sup>25</sup>. Estos resultados muestran que pacientes con un resultado positivo de PCR pueden ser diagnosticados como infectados por *T. cruzi*, pero para los pacientes con un resultado PCR negativo será necesario el uso de cualquiera de las otras pruebas para realizar el diagnóstico de infección por *T. cruzi*. Esto indica que las pruebas moleculares pueden confirmar el diagnóstico, pero no excluirlo (Fig. 1C). De hecho, estas pruebas moleculares mostraron de moderada a baja correlación con las demás pruebas (Tabla 2).

En conclusión, nuestra evidencia experimental sugiere que la estrategia de diagnóstico de la infección por *T. cruzi* en pacientes que han progresado a la fase crónica de EC se puede hacer mediante el uso de BioELISA Chagas o Chagatest ELISA recombinante v.3.0, que no sólo mostraron un mejor rendimiento diagnóstico, sino que también pueden confirmar y excluir el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*. Por otra parte, Chagas AB Rapid podría ser utilizado en los casos en que sea necesario un diagnóstico rápido. Por último, los ensayos moleculares se pueden usar para confirmar el diagnóstico; sin embargo, debido a la baja sensibilidad, especificidad y capacidad discriminatoria es importante la utilización de cualquiera de las otras pruebas para realizar el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*.

### Conflicto de intereses

Ninguno de los autores tiene un conflicto de intereses con la Institución financiadora y la Institución donde se realizó la investigación.

### Agradecimientos

Agradecemos a nuestros pacientes y a la *Fundación Cardiovascular de Colombia* por la evaluación clínica. Este trabajo fue apoyado por el proyecto 5661 de la Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

### Referencias

- WHO. First WHO report on neglected tropical diseases. WHO; Geneva, Switzerland: 2010.
- Rassi A, Jr, Rassi A, Marcondes de Rezende J American trypanosomiasis (Chagas disease). Infect Dis Clin North Am. 2012; 26(2): 275-91.
- Moncayo A, Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104(1): 17-30.
- Gutierrez R, Angulo VM, Tarazona Z, Britto C, Fernandes O. Comparison of four serological tests for the diagnosis of Chagas disease in a Colombian

endemic area. *Parasitology*. 2004; 129: 439–44.

5. Gomes YM, Lorena VM, Luquetti AO. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104(1): 115–21.

6. Pan American Health Organization Quantitative estimation of Chagas disease in the Americas. (OPS/HDM/CD/425-06). 2006.

7. Meira WS, Galvao LM, Gontijo ED, Machado-Coelho GL, Norris KA, Chiari E. *Trypanosoma cruzi* recombinant complement regulatory protein: a novel antigen for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Chagas' disease. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 3735–40.

8. Pereira-Chioccola VL, Fragata-Filho AA, Levy AM, Rodrigues MM, Schenkman S. Enzyme-linked immunoassay using recombinant transaldolase of *Trypanosoma cruzi* can be employed for monitoring of patients with Chagas' disease after drug treatment. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003; 10: 826–30.

9. da Silveira JF, Umezawa ES, Luquetti AO. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends Parasitol*. 2001; 17: 286–91.

10. Marcon GE, Andrade PD, de Albuquerque DM, Wanderley J da S, de Almeida EA, Guariento ME, et al. Use of a nested polymerase chain reaction (N-PCR) to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients and patients with doubtful serologies. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002; 43: 39–43.

11. Piron M, Fisa R, Casamitjana N, Lopez-Chejade P, Puig L, Verges M, et al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop*. 2007; 103: 195–200.

12. Deborggraeve S, Coronado X, Solari A, Zulantay I, Apt W, Mertens P, et al. *T. cruzi* OligoC-TesTa simplified and standardized polymerase chain reaction format for diagnosis of Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009; 3(6): e450.

13. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16: 1215.

14. Orozco LC. *Medición en Salud, Diagnóstico, Evaluación de Resultados. Un manual crítico más allá de lo básico*. Bucaramanga, Colombia: Publicaciones UIS; 2010.

15. Kraemer H. *Evaluating medical test. Objective and Quantitative Guidelines*. Newbury Park, USA: Sage publications, Inc; 1992.

16. Umezawa ES, Bastos SF, Camargo ME, Yamauchi LM, Santos MR, Gonzalez A, et al. Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. *J Clin Microbiol*. 1999; 37: 1554–60.

17. Ramirez JD, Guhl F, Umezawa ES, Morillo CA, Rosas F, Marin-Neto JA, et al. Evaluation of adult chronic Chagas' heart disease diagnosis by molecular and serological methods. *J Clin Microbiol*. 2009; 47: 3945–51.

18. Houghton RL, Benson DR, Reynolds LD, McNeill PD, Sleath PR, Lodes MJ, et al. A multi-epitope synthetic peptide and recombinant protein for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in radioimmunoprecipitation-confirmed and consensus-positive sera. *J Infect Dis*. 1999; 179: 1226–34.

19. Cotrim PC, Paranhos-Baccala G, Santos MR, Mortensen C, Cano MI, Jolivet M, et al. Organization and expression of the gene encoding an immunodominant repetitive antigen associated to the cytoskeleton of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1995; 71: 89–98.

20. Avila HA, Pereira JB, Thiemann O, De Paiva E, DeGrave W, Morel CM, et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *J Clin Microbiol*. 1993; 31: 2421–6.

21. Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejia Jaramillo AM, et al. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011; 5(1): e931.

22. Avila HA, Sigman DS, Cohen LM, Millikan RC, Simpson L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol*. 1991; 48: 211–21.

23. Gonzalez A, Prediger E, Huecas ME, Nogueira N, Lizardi PM. Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: its use in a high-sensitivity parasite detection assay. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984; 81: 3356–60.

24. Elias MC, Vargas NS, Zingales B, Schenkman S. Organization of satellite DNA in the genome of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 2003; 129: 1–9.

25. Gonzalez CI, Ortiz S, Solari A. Colombian *Trypanosoma cruzi* major genotypes circulating in patients: minicircle homologies by cross-hybridization analysis. *Int J Parasitol*. 2010; 40(14): 1685–92.