

ARTÍCULO ORIGINAL

Evaluación de una prueba rápida para el diagnóstico de la infección por Trypanosoma cruzi en suero

MYRIAM LORCA*,**, MARÍA DEL CARMEN CONTRERAS*, PATRICIA SALINAS*,
ALICIA GUERRA* y SYAMAL RAYCHAUDHURI***

EVALUATION OF A RAPID DIAGNOSIS TEST FOR *Trypanosoma cruzi* INFECTION IN SERUM SAMPLE

We tested a Rapid Diagnostic Test (RDT) to detect Trypanosoma cruzi infection using a total of 284 human sera, some of them from proved cases of Chagas disease (n = 145) and healthy individuals from non-endemic areas (n = 139). Another group included was non chagasic serum samples of individuals of other parasitic and non parasitic disease (n = 56), all of them with known serological test results. The RDT had a specificity of 99,3% and a sensitivity of 99,3%. The agreement with ELISA and IFAT was 98,2%. According to the results and the feasibility of the RDT should be an ideal tool for screening purposes in disease surveillance and intervention programs of Chagas disease.

Key words: Chagas disease, rapid diagnostic test, *Trypanosoma cruzi*.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o Trypanosomiasis americana es producida por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, que infecta a cerca de 16 millones de personas en América Latina¹. Además, debido a los efectos de la globalización y al aumento de los viajes y la inmigración desde los países centro y Sudamérica al resto del mundo, la infección se ha difundido en USA, Canadá y Europa².

Esta zoonosis parasitaria posee diversos mecanismos de infección, la más importante es la vectorial, a continuación la transmisión sanguínea, la transmisión transplacentaria, el trasplante de órganos y actualmente se han descrito algunos brotes epidémicos de infección vía oral¹⁻⁴.

La utilidad de los métodos diagnósticos

depende de la fase de la infección. En la fase aguda, cursa con altas parasitemias y los métodos diagnósticos directos son los más útiles y frecuentes de usar. Con posterioridad en la fase crónica, el diagnóstico está basado en la detección de anticuerpos por métodos serológicos⁵.

El diagnóstico serológico está basado en la detección de anticuerpos circulantes mediante reacciones convencionales tales como, la Reacción de Inmunofluorescencia Indirecta (RIFI), la Reacción de Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) y Reacción de Hemaglutinación Indirecta (RHAI). La OMS inicialmente recomendó el empleo para el diagnóstico rutinario de al menos dos pruebas serológicas de distinto fundamento. Posteriormente, ha recomendado la utilización de la prueba de ELISA como "screening" y su posterior

* Unidad Docente de Parasitología Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Santiago, Chile.

** Laboratorio Campvs. Santiago, Chile.

*** Inbios International Seattle Wa. USA.

Financiado en parte por Grant: NIH (R44 AI052683).

confirmación con alguna reacción serológica de diferente fundamento técnico⁶.

El diagnóstico serológico se realiza generalmente a través de reactivos comerciales que incorporan mezclas de complejos antigénicos citoplásmaticos (ELISA y RHAI) o al parásito propiamente tal como es el caso de la RIFI. Estos reactivos comerciales, en algunos casos incrementa la sensibilidad pero disminuyen la especificidad debido a reacciones cruzadas con otras infecciones como leishmaniosis⁶. Mas aún todas estas pruebas tienen problemas relacionados con su manejo técnico, cadena de frío, equipos etc lo cual los restringe a laboratorios especializados.

Todos los países que están afectados por la trypanosomiasis americana necesitan efectuar "screenings" poblacionales frecuentes con diversos objetivo; seleccionar donantes seronegativos, seleccionar embarazadas y niños menores de 15 para tratamiento médico, pero las técnicas convencionales no siempre ofrecen las facilidades técnicas ni de infraestructura como para aplicarlas en el campo. Ello ha demostrado la necesidad de un cambio de estrategia en el diagnóstico serológico de la infección por *T. cruzi*, la cual puede ser abordada mediante la prueba de diagnóstico rápida (RDT) asegurando el diagnóstico y efectividad del mismo en el campo⁷.

Las pruebas de diagnóstico rápido (RDTs), son relativamente fáciles de realizar, emplean cantidades mínimas de muestra, no demoran más de 10 minutos, su manipulación es fácil y por lo mismo requieren de personal entrenado para efectuarlos sin contratiempos en terreno careciendo de las facilidades de laboratorio⁸⁻¹⁰.

Muchos de los RDTs, no requieren refrigeración ni tampoco necesidad de luz eléctrica, por lo tanto un test bien validado ofrece potenciales gigantescos para los diagnósticos de screening de la infección por *T. cruzi*.

En este trabajo presentaremos los resultados obtenidos con una prueba rápida para enfermedad de Chagas RDT (*Trypanosoma Detect*TM, INBIOS International, Seattle, USA) en comparación con ELISA y RIFI en muestras de suero de individuos con infección por *T. cruzi* y en individuos no infectados (Sanos y con otras infecciones parasitarias y no parasitarias).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron un total de 350 muestras de

suero de las cuales :155 correspondieron a sueros de individuos con infección chagásica demostrada, 139 a individuos no infectados y 56 a individuos no chagásicos con otras patologías no parasitarias y parasitarias.

Todas las muestras fueron estudiadas por ELISA y RIFI para infección por *T. cruzi*.

Las muestras fueron sometidas a análisis con el Kit. INBIOS de acuerdo a las instrucciones del productor. Los estudios se realizaron en doble ciego.

El test rápido (RDT): Dipstick test *T. cruzi* Detect, (Inbios, Seattle, WA) se efectuó de acuerdo a las instrucciones de la empresa manufacturadora. La prueba está basada en un antígeno recombinante multiepitope mezclado con una solución de oro. El antígeno recombinante incluía las moléculas ITC-6 e ITC-8.2 derivados de diferentes antígenos de *T. cruzi*, incluyendo los péptidos 2, TcD, TcF, TcLo, y SAPA¹¹⁻¹².

Diez a 20 ul. de suero fueron dispuestos sobre la tira del "dipstick" y posteriormente se agregaron 3 gotas de la solución buffer reveladora, provista en el Kit. Después de 10 minutos se observó la línea de control rojo. Si el resultado fue positivo apareció una segunda línea por debajo del control en el campo donde se ubicó el antígeno.

La prueba de ELISA se realizó de acuerdo a trabajos previos¹³. En resumen, se sensibilizaron pocillos de poliestireno con un extracto crudo de formas epimastigotes de *T. cruzi* a una concentración de 2 ug /ml. Las placas posteriormente fueron bloqueadas con solución de buffer con leche descremada al 5%, lavadas y congeladas hasta el momento de su empleo¹³.

La prueba RIFI: realizada de acuerdo a la metodología estandarizada¹⁴ modificada en nuestro laboratorio⁵. Se uso formas epimastigotes de cultivo Diamond formalizadas y adheridas a portaobjeto previamente enmarcados. Se efectuó la dilución del suero (1/20) y se incubó por 45 minutos a 37° C. Posteriormente se sometió a intensos lavados con Buffer fosfato Ph 7,2, seguido por un proceso de secado e incubación por 45 minutos a 37 °C, con el segundo anticuerpo conformado por anti IgG humana marcada con isotiocianato de fluoresceína mas azul de Evans como contracolorante. Las laminas posteriormente fueron lavadas y leídas al microscopio de luz UV (Olympus PS -2DC con lámpara de halógeno de 12 volts) con aumento de 40X.

RESULTADOS

Con el fin de evaluar la utilidad del RDT (Dipstick test). Se extrajo la sangre para los exámenes serológicos, previo consentimiento informado del paciente y se guardó en condiciones de -20 C hasta su empleo. Posteriormente, se procedió a realizar las técnicas serológicas convencionales analizando las muestras al azar. y sin conocer los resultados de ELISA ni RIFI.

En la Tabla 1 se muestra la concordancia de 98,2% en los resultados (279/284). La concordancia de los resultados en las muestras positivas alcanzó a un 97,4% y en las muestras negativas de 98,9%.

De acuerdo a estos resultados el reactivo INBIOS tuvo una sensibilidad de 99,3% con 0,01% de falsos positivos sobre el total de casos estudiados y una especificidad de 99,3% con un total de 0,7 de falsos negativos sobre el total de muestras. El estudio fue practicado en doble ciego, primero se estudiaron muestras de suero analizadas previamente con ELISA e IFAT y a continuación con el RDT (Dipstick test).

En la Tabla 2 se señala el análisis de los resultados discordantes entre la serología convencional y la prueba rápida. Los falsos positivos fueron dos muestras pero al ser

Tabla 1. Resultado obtenido en muestras de suero de pacientes chagásicos e individuos no chagásicos con el Dipstick Kitt de INBIOS y la serología convencional ELISA y RIFI

	Positivo Serología Convencional	Negativo Serología Convencional	Total
Positivos INBIOS	142	2	144
Negativos INBIOS	3	137	140
Total	145	139	284

Sensibilidad: 99,3%
Especificidad: 99,3
Concordancia: 98,2%

repetidos con la serología convencional el resultado fue positivo, mostrando una correlación total en las muestras positivas con una concordancia de 100%. Pero se mantuvieron los resultados en 3 casos falsos negativos.

En la Tabla 3 se observa que no existe reactividad cruzada en los resultados mostrados por el Dipstick y la serología convencional.

DISCUSIÓN

Los distintos problemas diagnósticos existentes en la infección por *T. cruzi* han obligado a los investigadores a dos acciones fundamentales, en primer lugar mejorar la calidad de los antígenos empleando moléculas recombinantes o péptidos sintéticos en mezclas alternativas a los antígenos convencionales^{6,13,14}. Por otra parte, los soportes de las reacciones se han mejorado de tal forma que se ha incrementado la sensibilidad y especificidad de los mismos^{6,8-10}.

Pero además se ha agregado un tercer componente a las necesidades diagnósticas y es la rapidez y facilidad necesaria especialmente para el trabajo de campo. Esa es la alternativa que evaluamos en el presente trabajo, la “utilidad de una prueba rápida frente a pruebas convencionales” lo que podría ser de gran ayuda para el trabajo de campo y estudios poblacionales^{1,7}. El análisis del reactivo empleando

Tabla 2. Análisis de los resultados discordantes obtenido entre la serología convencional y la prueba rápida INBIOS *Trypanosoma cruzi*

	RIFI	ELISA	INBIOS
1	Positivo 1/20	Negativo	Negativo
2	Positivo 1/20	Negativo	Negativo
3	Negativo	Negativo	Positivo débil
4	Negativo	Negativo	Positivo
5	Negativo	Negativo	Positivo débil

Tabla 3. Resultado del Kitt Dipstick de INBIOS para *Trypanosoma cruzi* en sueros de individuos con otras patologías parasitarias y no parasitarias

Patología	Tipo Seropositivos/ Total casos
Parasitaria	Toxoplasmosis 0/10
Infecciosas No parasitarias	TBC y VDRL 0/20
Autoinmune	Factor reumatoide 0/17
Ca	Ag. prostático 0/9
	Total 0/56

muestra de suero demostró una concordancia de resultados entre INBIOS y la serología convencional de 98,2% (279/284)¹¹. La especificidad de la prueba en estas muestras alcanzó a 99,3%. (Tabla 2). Inicialmente se encontraron dos falsos positivos (0,07%), pero al repetirlos mediante serología convencional los resultados fueron positivos, mostrando total concordancia (Tabla 2), lo cual nos induciría a pensar que la especificidad real alcanza a 100%. Hecho corroborado también en la Tabla 3, donde no se observó reactividad cruzada donde la técnica presentó una óptima especificidad tanto en los sueros no chagásicos normales como también aquellos testeados para reacción cruzada como factor reumatoide, TBC, toxoplasmosis.

Desde el punto de la sensibilidad, esta alcanza a 99,3% con un 0,01% de falsos resultados negativos. Los cuales al ser repetidos demostraron concordancia con ELISA no así con RIFI que presentó títulos “borderline”, lo cual nos podría hacer pensar que los pacientes presentan serología discordante incluso en las pruebas convencionales. De acuerdo a los estudios de⁶, usualmente existe entre dos o más reactivos discordancias cercanas a 2% de la muestra. Debemos resaltar que la propuesta es su empleo para trabajo de campo donde se propone solo el tamizaje pero la confirmación debe hacerse por los métodos convencionales, lo cual haría al reactivo INBIOS muy buen test rápido para el diagnóstico.

Por otra parte, el Dipstick tuvo una muy buena concordancia con la serología convencional RIFI y ELISA. La prueba es fácil de realizar, y requiere pequeñas muestra de suero.

Este tipo de prueba rápida para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas tiene muchas ventajas sobre las pruebas convencionales, debido en primer lugar a su aplicación en un gran número de muestras, las cuales son procesadas sencilla y rápidamente, con mínimos esfuerzos.

En segundo lugar al compararlo con la serología convencional, los métodos de diagnóstico molecular y otros métodos de diagnóstico se requiere experiencia técnica, entrenamiento y personal calificado, el dipstick es una prueba que además no requiere de un laboratorio especializado. Por último desde un punto de vista epidemiológico esta prueba permite su aplicación en intervenciones epidemiológicas in situ, tales como la vigilancia

serológica, detección de poblaciones chagásicas para tratamiento. Reduciendo los costos operacionales de los programas y obteniendo una herramienta de “screening” económica.

RESUMEN

Con el fin de evaluar la utilidad práctica, y la sensibilidad y especificidad del test rápido Dipstick test *Trypanosoma cruzi* Detect, (Inbios, Seattle, WA) se estudiaron 284 sueros humanos de los cuales 145 correspondieron a casos probados de infección chagásica y 139 a individuos sanos de zonas no endémicas. Todos ellos analizados previamente con las Técnicas de ELISA y de Inmunofluorescencia Indirecta para la detección de anticuerpos IgG anti *T. cruzi*. Además se estudiaron 56 muestras serologicamente negativas para enfermedad de Chagas pero que presentan otras patologías parasitarias y no parasitarias. El “test” rápido de INBIOS demostró una especificidad de 99,3% al igual que la sensibilidad. Y una concordancia con La ELISA y la RIFI de de 98,2%. De acuerdo a estos resultados y a la facilidad de su ejecución, Dipstick test *T. cruzi* Detect (INBIOS) resulta ideal como tamiz para la vigilancia y los programas de intervención de la enfermedad de Chagas.

REFERENCIAS

- 1.- WORLD HEALTH ORGANIZATION 2002. Control of Chagas disease WHO Tech Report Ser. 905: 24-8.
- 2.- SCHMUÑIS G A, ZICKER F, PINHEIRO P, BRANDLING-BENNETT D. Risk for transfusion-transmitted infectious disease in Central and South America. Emerg. Infect. Dis. 4:5-11., World Health Organization. 2002. Control of Chagas disease. Second report of the WHO Expert Committee. WHO Tech. Rep Ser 1998; 905: 59-90.
- 3.- RODRÍGUEZ-MORALES A J. Chagas disease: an emerging food-borne entity? J Infect Developing Countries 2008; 2: 149-50.
- 4.- CALVO MÉNDEZ M L, NOGUEDA TORRES B, ALEJANDRE AGUILAR R. The oral route: an access port for *Trypanosoma cruzi*. Rev Latinoam Microbiol 1992; 34: 39-42.
- 5.- LORCA M, THIERMANN E. Congenital Chagas disease and its serological diagnosis through conventional serology and methods of molecular biology. In Biology of parasitism. Ehrlich R and Nieto A. Eds. Trilce Montevideo, Uruguay.1994; 160-6.
- 6.- LUQUETTIA, RASSIA. Diagnóstico laboratorial da infeccion pelo *Trypanosoma cruzi* p344-378 In Z Brenner. Z Andrade and M Barral _Neto (Eds)

- Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas 2nd ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, Brazil. 2000.
- 7.- TECHNICAL REPORT INTERNATIONAL MEETING: New diagnostic tests are urgently needed to treat patients with Chagas disease. Médecins Sans Frontières. Campaign for Access to Essential Medicines. Rio de Janeiro, Brazil, 30-31 August 2007. Rev Soc Brasil Med Trop 2008; 41: 315-9.
 - 8.- LUQUETI A, PONCE C, PONCE E, et al. Chagas diagnosis a multicentric evaluation of Chagas stat pack, a rapid immunochromatographic assay with recombinants protrins of *Trypanosoma cruzi*. Diag Microbiol Infect Dis.2003; 46: 265-71.
 - 9.- RABELLO A, LUQUETI A, MOREIRA E, et al. Serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection using the new particle gel immunoassay ID. PaGia. Chagas Mem Ins Oswaldo Cruz 1999; 94: 77-82.
 - 10.- SAEZ-ALQUEZAR A, SABINO E, SALLES N, et al. Serological confirmation of Chagas disease by a recombinant and peptide antigen line immunoassay INNOLIA Chagas. J Clin Microbiol 2000; 38: 851-4.
 - 11.- BETONICO G .N, MIRANDA E O, SILVA D A O, et al. Evaluation of a synthetic tripeptide as antigen for detection of IgM and IgG antibodies to-*Trypanosoma cruzi* in serum samples from patients with Chagas' disease or viral diseases. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 1999; 93: 603-6.
 - 12.- HOUGHTON R L, STEVENS Y Y, GUDERIAN J, et al. Geographically robust lateral flow immunoassay for diagnosis of *T. cruzi* infection with high correlation to radio-immunoprecipitation assay (RIPA) Am J Trop Med Hyg 2006; 75: abstract #500, p146.
 - 13.- CONTRERAS M C, SALINAS P, SANDOVALL, et al. Utilidad de la ELISA IgG en muestras de sueros y eluidos de sangre en papel filtro en el inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas. Bol Chil Parasitol 1992; 47: 76-81.
 - 14.- CAMARGO M, SEGURA E, KAGAN I, et al. Collaboration on the standarization of Chagas disease in the Americas: An appraisal. PAHO Bull 1986; 20: 233-4.
 - 15.- LORCA M, GONZÁLEZ A, REYES V, et al. The diagnosis of chronic Chagas' disease using recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi*. Rev Méd Chile 1993; 121: 363-8.

Correspondencia a:

Myriam Lorca

Chacabuco 785 piso 2, Santiago Centro.

Santiago, Chile. Fono: 56 2 681 6053. Fax: 56 2 681 3207.

E mail: clorca@med.uchile.cl -mlorca@campvslab.cl