

EVALUACIÓN DE HERRAMIENTAS MOLECULARES E INMUNOLÓGICAS EN EL FORTALECIMIENTO DEL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

1. INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Chagas fue descubierta en 1909 por el investigador brasileño Carlos Riveiro Justiniano Das Chagas (1879 – 1934). A esta nueva especie la denominó *Tripanosoma cruzi* en homenaje a Oswaldo Cruz, su maestro. Tras intensos estudios de laboratorio descubrió en el contenido intestinal (heces) de los insectos sospechosos (chinchas o reduvídeos) el parásito unicelular microscópico causante de esta enfermedad.

La Enfermedad de Chagas (o Tripanosomiasis Americana) es una antropozoonosis de países subdesarrollados y se encuentra principalmente en Latinoamérica, en los países del Cono Sur. En amplias regiones de éste se la tiene como una parasitosis endémica. Se tienen datos de que existen unos 16 a 18 millones de individuos infectados en 15 países de Latinoamérica, de los cuales aproximadamente 70 % corresponden al Hemisferio Sur. Se estima que unas 100 a 120 millones de personas, o sea el 25% de la población de esta parte del mundo, que se extiende desde la Patagonia Argentina hasta México, están en riesgo de infectarse, (1, 2, 3, 5, 6, 7, 12) especialmente en zonas rurales, aunque también en zonas urbanas, donde habita el vector.

La mayoría de la población susceptible está formada por sujetos originarios de áreas rurales y pertenecientes a la categoría socioeconómica denominada baja (con escasos o nulos recursos). Por ello, la Enfermedad de Chagas es una de las 14 patologías prioritarias para la OMS/OPS dentro del programa: “WHO Strategic Plan to Combat Neglected Tropical Diseases (NTDs)” un plan de la OMS/OPS para el Control de las Enfermedades Desatendidas. (5, 6, 7)

La patología de Chagas adquiere trascendencia ya que es una patología que no puede ser curada con tratamientos específicos o inmunoterapia. Es un problema importante de salud

pública en América Latina, y de creciente preocupación en Estados Unidos y Europa debido al aumento de inmigrantes infectados (14).

La Enfermedad de Chagas es producida por el *Trypanosoma cruzi*, un parásito protozoario de humanos y de una variedad de especies de animales, algunas de ellas domésticas. Es naturalmente transmitida a huéspedes mamíferos a través de heces de triatomídeos hematófagos infectados, el *Triatoma infestans* o vinchuca (en nuestra región, ya que es otra especie de triatoma en otras regiones). Sin embargo, la transmisión vectorial no es la única porque también la enfermedad puede ser transmitida congénitamente, por transfusiones de sangre o por órganos transplantados, por contaminación accidental en el laboratorio (punción accidental, manejo de animales contaminados), entre otras.(5, 6, 12)

Para detectar las diferentes formas de transmisión, es importante elegir los métodos más adecuados de diagnóstico. Actualmente se cuentan con métodos de diagnóstico de la enfermedad de Chagas que, si bien son buenos, no son lo suficiente sensibles y específicos para discriminar la etapa de la enfermedad y las reacciones cruzadas con otras entidades. Se tienen pruebas serológicas convencionales, cuya sensibilidad oscila entre 94 a 98% en fase crónica de la enfermedad, pero presentan el problema de dar un número variable de casos reactivos en lo que corresponde a la Zona Gris, cerca de la línea de corte (Cut-off), dando resultados no concluyentes.

Las pruebas de diagnóstico convencionales de la enfermedad de Chagas emplean extractos antigénicos de la forma de epimastigotes del *Trypanosoma cruzi* y se constituye por una mezcla compleja de moléculas que favorecen la aparición de reacciones cruzadas (generalmente “falso positivas”) con el suero de pacientes que tienen otras infecciones, especialmente aquellas cuyo causante es de la misma familia que el *T. cruzi*, la leishmaniasis. Además, esta heterogeneidad antigénica no permite un diagnóstico diferencial definido entre la fase aguda y la fase crónica de la enfermedad.

Un Problema persistente con los análisis de laboratorio actuales es la poca especificidad de los métodos y esto se debe al tipo de antígenos utilizados, los mismos que puedan dar resultados no concluyentes debido a las reacciones cruzadas, especialmente de los epítopes similares de otros parásitos de la gran familia Tripanosomidae.

Desde este punto de vista, surge una interrogante principal: ver si la evaluación de nuevas herramientas moleculares e inmunológicas, logrará el fortalecimiento del diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Y, esto se resolverá si en todos los países donde existe el problema de la enfermedad de Chagas, se realizan evaluaciones de las diferentes propuestas de antígenos y otras herramientas de diagnóstico.

Por todo ello, se tiene claro que es importante contar con un diagnóstico preciso y así saber de qué patología es portador el paciente. Es necesario buscar métodos mucho más sensibles y específicos para realizar un buen control epidemiológico y para realizar el tratamiento adecuado a los pacientes. Los métodos elegidos, además, deben ser de fácil ejecución, y de fácil acceso a los laboratorios de diagnóstico. La Organización Mundial de la Salud hace énfasis en esta necesidad de contar con antígenos definidos en el desarrollo de la serodiagnos de la enfermedad de Chagas (26). Por ello se apuntala a la prueba de antígenos recombinantes ya que ésta disminuye riesgos de operación, pues sólo se manipula ADN obtenido en forma masiva en cultivos de bacterias, con necesidades de reproducción mínimas.

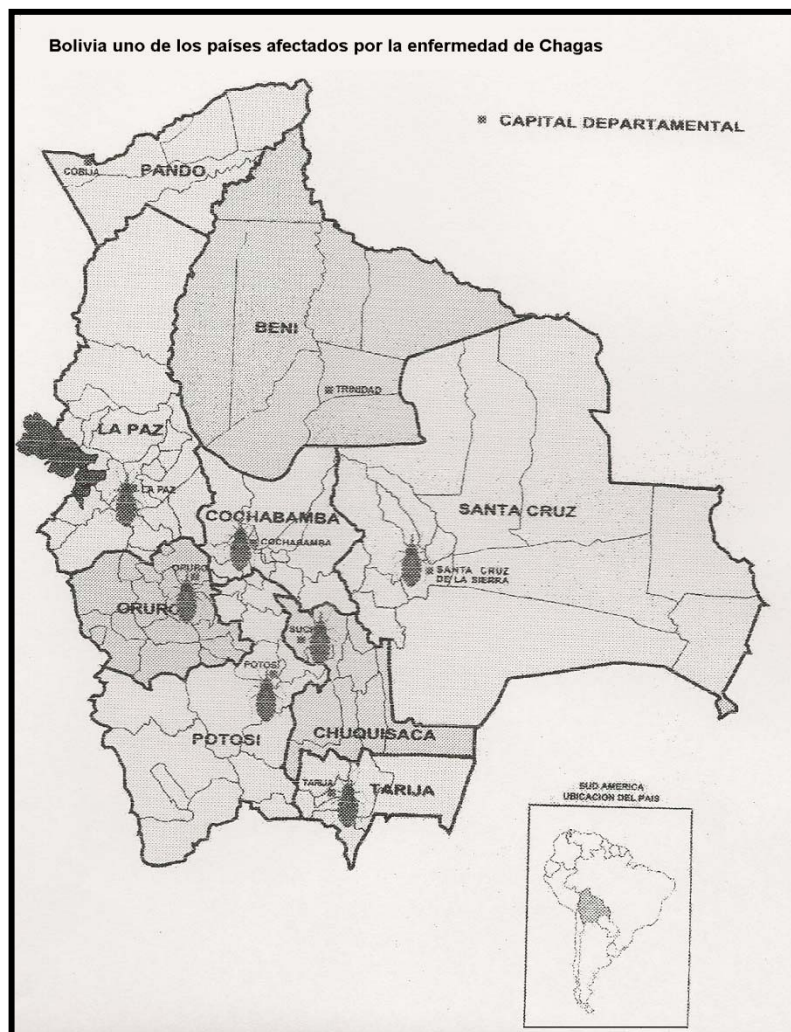
Otra alternativa es la evaluación del antígeno soluble de Excreción y Secreción de Trypomastigotes (TESA) como método de diagnóstico diferencial entre fase aguda y crónica. En pruebas realizadas, este antígeno fue reconocido por el 100% de los pacientes con la enfermedad en fase crónica y no fue reconocido por sueros de pacientes con otras enfermedades parasitarias. Posteriormente, TESA fue ensayado con el método ELISA, resultando con muy alta sensibilidad y especificidad (26). Por todo esto este antígeno es bastante adecuado para realizar un eficiente seguimiento de tratamiento (21).

El presente estudio pretende evaluar antígenos que podrían ser más adecuados para la búsqueda de esa unión de sensibilidad y especificidad de las pruebas, para mejorar el diagnóstico diferencial y seguimiento terapéutico de la enfermedad de Chagas.

2. ANTECEDENTES

El Chagas es la tercera enfermedad tropical más importante en América Latina, en cuanto a morbilidad y mortalidad (2, 4, 19). Es así que en 35% de los infectados, el mal se manifiesta recién en la edad adulta, entre los 20 y 40 años, lo cual significa una pérdida en el potencial humano económicamente activo y ello representa un elevado costo social (1,2).

Por otra parte, en Bolivia, la Enfermedad de Chagas es una patología que constituye un problema prioritario de salud pública ya que el área endémica para Chagas abarca 7 de los 9 departamentos, es decir, un 80 % del territorio del país. En muchas de estas regiones se vive en condiciones de vivienda y sanitarias sumamente deterioradas, además de existir falta de educación e higiene. Todo ello representa un problema epidemiológico, tanto por su magnitud como por su impacto social (7, 8, 9, 10, 11, 19)



Bolivia es uno de los países latinoamericanos con más alta prevalencia en la Enfermedad de Chagas, que es del 40,3 % de la población, de los que del 15 al 28% presenta cardiopatía chagásica. Además que también se presentan muchos casos de Chagas Congénito, debido a la transmisión materna (8, 9, 10). Según datos del año 2003, del Ministerio de Salud de Bolivia, unas 3.500.000 personas están en riesgo de contraer la enfermedad, de las cuales 1.800.000 están infectadas (SEDES, 27)

Transmisión. El agente, *Trypanosoma cruzi*, es un parásito principalmente transmitido por el insecto reduvídeo infectado que se alimenta de sangre de mamíferos (hematófago) y que es del grupo de triatomíneos, un tipo de insectos habituales en Iberoamérica. Cuando el insecto portador del parásito pica, deposita heces (conteniendo al parásito) en la piel de la víctima. Cuando ésta se rasca en la región de la picadura, las heces que contienen el parásito entran en su sangre.

Triatoma infestans



Al respecto de la transmisión vectorial, la OMS impulsó fuertemente el control de la transmisión vectorial, mismo que fue abordado en la mayoría de los países del Cono Sur, incluido Bolivia (2, 3, 4, 16, 27).

El *Trypanosoma cruzi*, además, es la etiología más frecuente de las infecciones congénitas de Chagas en Bolivia; la madre infectada puede transmitir el parásito en etapa aguda o crónica de su enfermedad, cuando habita en zona endémica o donde haya migrado (8, 9). Por eso, esta forma de transmisión (vía transplacentaria) representa un riesgo adicional junto a la transmisión debida a transfusión de sangre. Ambas formas representan aproximadamente un 20% de los casos de infección. (8, 9, 10, 11, 19). Con mucho menos frecuencia, la transmisión se produce por transplantes de órganos.

No existe vacuna contra la enfermedad de Chagas y las personas afectadas pueden volver a infectarse después de recibir tratamiento. (5, 6, 12, 13, 15)

La enfermedad se expresa en forma aguda, por lo regular en niños, como un Síndrome hepatoesplenoadénico febril, y más raramente como miocarditis o meningitis. La forma crónica se presenta en buena parte de los adultos sin síntomas, por ello esta enfermedad puede pasar desapercibida por mucho tiempo (20-30 años) y esto es lo peligroso; puede manifestarse como enfermedad cardíaca pues se produce miocarditis aguda cuando el corazón es dañado por la invasión del parásito. Este efecto puede conducir a la muerte repentina (13, 20).

En el aspecto epidemiológico es muy importante la detección temprana de la Enfermedad de Chagas, en forma certera y a bajo costo. Por ello, en la lucha por controlar la enfermedad y su transmisión, el diagnóstico ha jugado un papel muy importante.

Diagnóstico.- El diagnóstico de la Enfermedad de Chagas se realiza de acuerdo a la etapa en la que se prevé está la enfermedad. En la fase aguda se basa principalmente en la detección del parásito mismo (directo). Sin embargo, en la fase autolimitada o cuando pasa a la fase crónica es muy difícil hallar carga parasitaria detectable por los diferentes métodos directos, por ello se buscan anticuerpos específicos. El sujeto infectado genera una respuesta inmune y es por ésta que se encuentran los anticuerpos circulantes que persisten toda la vida. De este modo, el diagnóstico serológico es, junto a los datos epidemiológicos y la clínica, el elemento central en el diagnóstico de esta enfermedad (17)

Se asume que el diagnóstico precoz y la iniciación del tratamiento específico (si el diagnóstico es certero), pueden tener grandes posibilidades de lograr la cura parasitológica. Ésta puede ser valorada con el uso de la serología, que ahora se ve reforzada con la tecnología de herramientas moleculares (Ej.: Antígenos Recombinantes) y con herramientas inmunológicas y serológicas (Ej.: antígenos obtenidos de cultivos celulares, ej.: TESA). (18)

La OMS ha enfatizado la necesidad de buscar alternativas de antígenos para mejorar el serodiagnóstico de la Enfermedad de Chagas. Estos antígenos deben seguir los siguientes

criterios (según Ana María Stolf):“Deben estar presentes en todas las cepas aisladas de diferentes áreas endémicas, no estar presentes en otro agente etiológico de enfermedades infecciosas, ser altamente inmunogénicos, estables y fácilmente obtenidos para ser utilizados en test serológicos”. El problema está en desarrollar test que ofrezcan buenos resultados en cuanto a sensibilidad, especificidad y también reproducibilidad, además de ser simples y prácticos para su manipulación y criterio de interpretación.

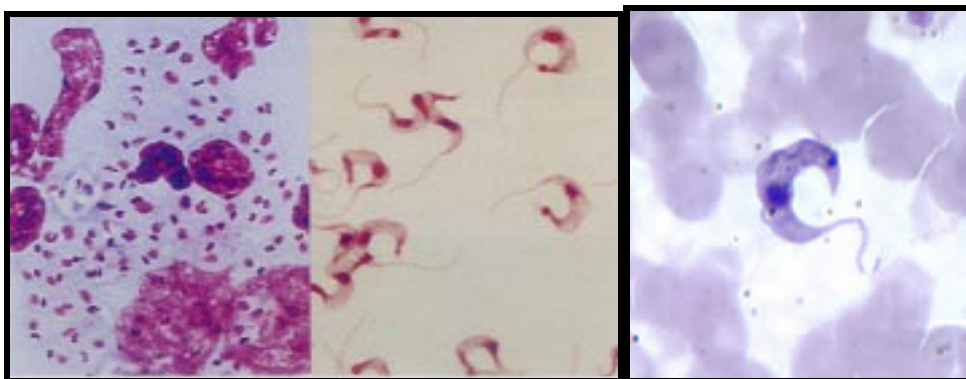
En Latinoamérica, grupos de investigadores trabajaron al respecto y ya se están utilizando kits elaborados comercialmente con este tipo de técnicas innovadoras (13, 19, 21 y 22).

3. MARCO TEÓRICO

La enfermedad de Chagas es causada por el *Trypanosoma cruzi*, un parásito protozoario de humanos y de una variedad de especies de animales, algunas de ellas domésticas. Es así que los reservorios de este parásito son perros, gatos, roedores e incluso gallinas, además de otros animales salvajes. Los mismos no padecen la enfermedad porque generalmente su temperatura corporal es más elevada y porque el parásito no realiza en ellos parte de su ciclo de vida causante de patología.

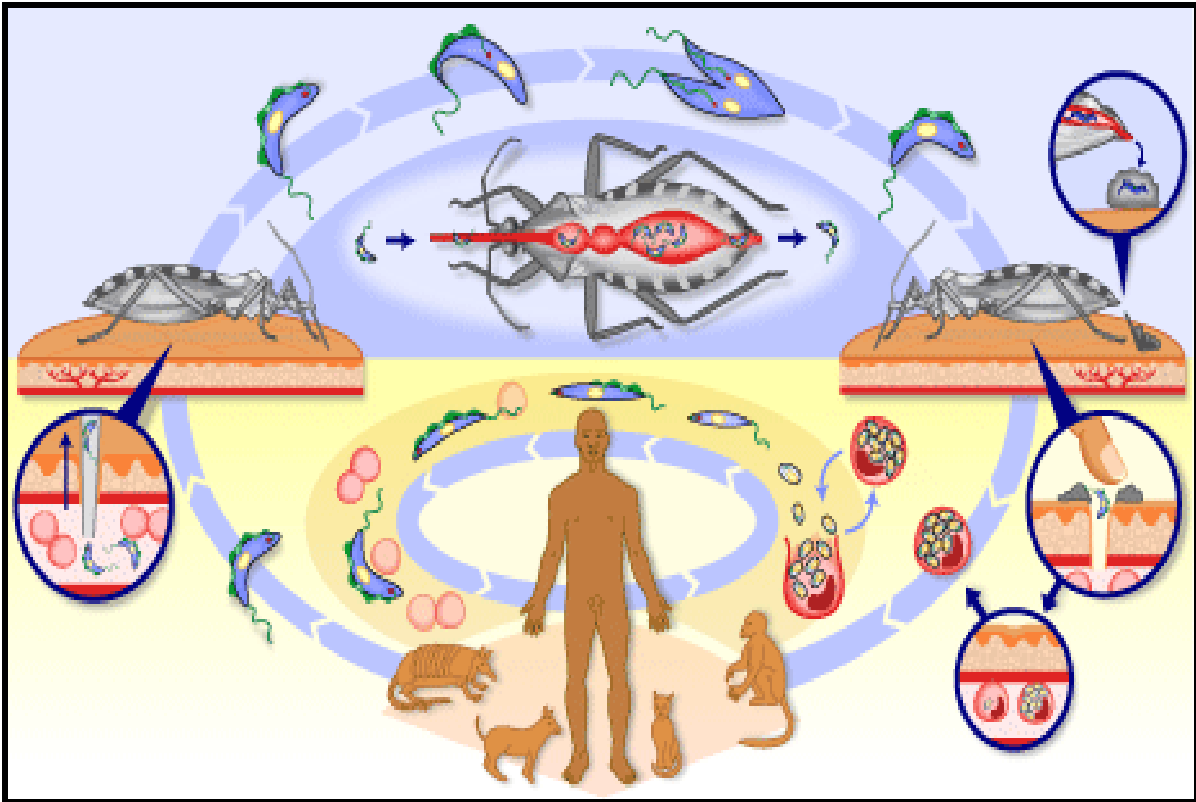
Agente etiológico: *Trypanosoma cruzi*.-Cuando el vector, el triatomídeo o vinchuca, que es hematófago, chupa la sangre de uno de estos reservorios infectados, el parásito (*Trypanosoma cruzi*) penetra en su sistema digestivo adquiriendo la forma de trypomastigote, que es el clásico tripanosoma con su membrana ondulante en el borde del cuerpo. Esta membrana nace en el extremo del cuerpo y tiene un borde externo que, en su otro extremo, es el flagelo. En este momento, el núcleo queda situado en medio del parásito y el kinetoplasto, su mitocondria, produce el ATP suficiente para dar energía al cuerpo del parásito. Este kinetoplasto posee ADN circular, de gran importancia por la información genética que contiene y que sirve para obtener las herramientas moleculares útiles para el diagnóstico del parásito en el huésped.(23)

***Trypanosoma cruzi* - Formas: amastigota y trypomastigota sanguíneo**



En su **ciclo vital**, el parásito exhibe formas de amastigota, epimastigota y trypomastigota, además de las formas de transición entre éstas. En los hospederos vertebrados están los trypomastigotes sanguíneos y los amastigotes intracelulares, en cuanto a los hospederos

invertebrados y en medios de cultivo predominan las formas epimastigotas, que pasan después a tripomastigotas metacíclicas.



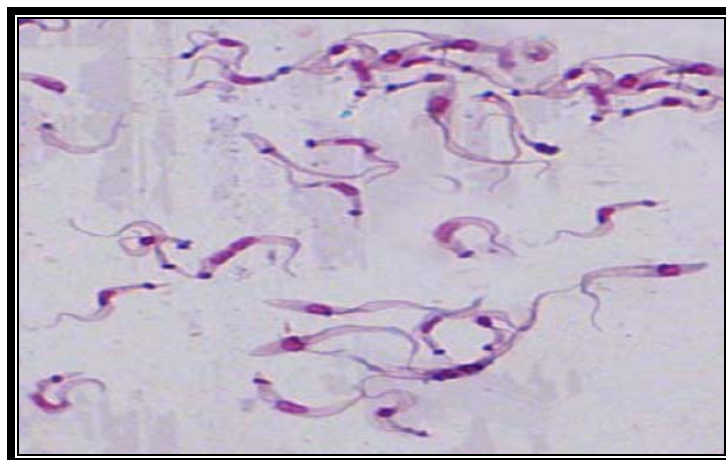
Así, siguiendo su ciclo, el tripanosoma pasa al estómago del triatómico, donde sufre transformaciones, adoptando la forma de esferomastigote. Éste madura hacia la forma de epimastigote que se caracteriza por tener el núcleo desplazado hacia un extremo y el kinetoplasto y flagelo con restos de membrana hacia el otro extremo. Los epimastigotes maduros aparecen en mayor cantidad en el último tramo del intestino del insecto, por lo cual algunos investigadores indican que serían las formas infectantes. Sin embargo, es en esta región rectal del intestino posterior del insecto donde los parásitos se transforman en tripomastigotes metacíclicos que son eliminados en las heces.(23)

Cuando ingresa en el torrente sanguíneo del huésped vertebrado (el humano entre ellos), el parásito se presenta con un pequeño flagelo, midiendo entre 10 y 25 μm de largo por 1 a 5 μm de ancho (28).

Estas formas flageladas pueden ser fagocitadas por mononucleares o invadir los más variados tipos de células de los hospederos, especialmente las células del Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) y las fibras estriadas, tanto cardíacas como esqueléticas, además de las fibras musculares lisas y las células nerviosas también. Cuando estas formas flageladas invaden las células SFM del tejido cutáneo circundante, adquieren la forma amastigota para multiplicarse. Luego, pasan nuevamente a la sangre como trypomastigota sanguíneo y se diseminan por el organismo, atacando músculos y otros tejidos. El ciclo cierra cuando el paciente es picado por otro triatomíneo y las formas tripomastigotas sanguíneas llegan al intestino del insecto (23)

Cuando el parásito está en la forma de trypomastigote, puede adquirir dos morfologías; una larga y fina y otra gruesa. Las formas delgadas no penetran en las células del hospedero vertebrado y persisten mucho tiempo en la sangre, y son también poco sujetas a la fagocitosis por los macrófagos. Estas formas tienden, por tanto, a acumularse en la sangre y caracterizan a la parasitemia de los períodos crónicos de la infección. Ellas son mucho más infectantes para los triatomíneos.(23)

Si se trabaja con medios de cultivo para obtener crecimiento de tripanosomas, es en la forma de epimastigotes (rosetas de éstos) como se presentan y, por lo mismo, su manipulación es de alto riesgo.



Formas epimastigotas (núcleo rojizo) y tripomastigotas (núcleo negruzco) de *T. cruzi* en medio de cultivo. El cultivo de *T. cruzi* "in vitro" reproduce el ciclo del parásito que sigue en el invertebrado.

Sin embargo, cuando se utilizan cultivos celulares, es posible obtener la forma de trypomastigote, que constituye la forma madura del parásito, por lo cual tiene las proteínas más complejas y específicas de su especie, lo cual se utiliza a favor de obtener antígenos más específicos como herramientas en técnicas de diagnóstico (28)

La Enfermedad de Chagas se presenta en tres fases diferentes: la fase aguda se manifiesta por tres signos clínicos importantes: la hipertermia, hipoesplenomegalia y adenopatias asociadas con edema palpebral: se presenta el clásico Signo de Romaña.



La fase aguda generalmente se resuelve naturalmente y el huésped infectado permanece asintomático durante mucho tiempo (hasta décadas) y después de este tiempo se pueden detectar las manifestaciones clínicas de la fase crónica (daño cardíaco, digestivo y otros) Es así como esta fase aparece tardíamente y se caracteriza por disturbios de órganos huecos principalmente corazón, esófago e intestino grueso. La localización parasitaria generalmente es única, y es poco frecuente encontrar pacientes con cardiopatía y megaesófago a la vez, esto puede ser atribuido a una especificidad de cepa (23)

Esta enfermedad se caracteriza por la aparición cronológica de clases específicas de anticuerpos, durante el desarrollo de la infección, dependiendo de la fase de la enfermedad. Anticuerpos del tipo IgM son los primeros en aparecer como un típico signo de la fase aguda de la enfermedad. También se reporta el incremento del anticuerpo del tipo IgA en la fase temprana del mal. Anticuerpos del tipo IgG se presentan también, en ocasiones, en la fase temprana. Pero generalmente tienen la característica de su incremento y permanencia durante la fase crónica de la enfermedad. (17)

La detección de anticuerpos frente a los antígenos de *Trypanosoma. cruzi* por métodos serológicos es todavía el principal soporte del diagnóstico y seguimiento terapéutico de la Enfermedad de Chagas.

3.1 DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.

El diagnóstico de la Enfermedad de Chagas se basa en antecedentes epidemiológicos y clínicos, ya que las manifestaciones clínicas de la etapa latente y de la fase crónica, tardan mucho en aparecer.

Se tienen dos grandes grupos de métodos convencionales del diagnóstico de la Enfermedad de Chagas: Métodos Parasitológicos Directos y Métodos Indirectos.(28)

3.1.1 Métodos Parasitológicos Directos

Estos métodos son más específicos ya que se basan en la búsqueda del mismo parásito, y ello los hace más confiables. Pero, tiene la desventaja de no presentar buenos resultados cuando la parasitemia es baja. Se pueden requerir varias preparaciones y bastante tiempo para encontrar al parásito. Además, en la etapa crónica, rara vez se logra demostrar la presencia del parásito. Ejemplo de éstos métodos son: Examen en Fresco, Extendido sanguíneo coloreado (Tinción Giemsa), Método de Concentración de Strout, etc.

3.1.2 Métodos Indirectos

Dentro de éstos se tienen los Métodos Parasitológicos Indirectos y los Métodos Serológicos.

3.1.2.1 Métodos Parasitológicos Indirectos

Estos tienen el fin de multiplicar in-vitro, a partir de diferentes muestras del paciente. Son más sensibles que los anteriores, pero tardan mucho más tiempo. Se utilizan en la fase crónica de la enfermedad, donde la parasitemia es baja. Ejemplos son: Xenodiagnóstico, Cultivos de cepas escogidas del parásito, Inoculación en animales. Según algunos autores

pertencen a este grupo, las técnicas moleculares de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), las cuales buscan el rastro de ADN del parásito que estuvo presente unas horas antes en el fluido o muestra obtenidos. Mediante ésta, secuencias repetitivas determinadas en el DNA de *Trypanosoma cruzi*, pueden ser amplificadas con un alto grado de eficiencia, después de ciclos sucesivos de multiplicación exponencial.

3.1.2.2 Métodos Serológicos

Estos métodos no buscan al parásito mismo sino alguna evidencia de su presencia anterior o actual. La mayoría de estas pruebas detectan la presencia de Anticuerpos de respuesta ante la invasión del antígeno (que es la presencia del parásito en algún momento de la vida del paciente) en el organismo, o también la presencia de anticuerpos contra constituyentes específicos del parásito. Según la respuesta del nivel de anticuerpos (título obtenido), puede dar una apreciación del avance de la enfermedad y en que fase se encuentra.

Los métodos serológicos más importantes son: Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), Hemaglutinación Indirecta (HAI), Reacción de Fijación de Complemento (FC), Reacciones inmunoenzimáticas como ELISA y otras.

3.1.2.2.1 Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

La técnica está basada en la capacidad de los anticuerpos de unirse a ciertos colorantes fluorescentes, sin alterar sus propiedades inmunológicas

Utiliza como antígeno las formas tripo o epimastigotes del *T. cruzi*, los cuales son fijados en láminas de microscopía, como improntas. Los anticuerpos están presentes en el suero y cuando existe el contacto con el antígeno de la impronta, reaccionan contra los epítopes del parásito fijado, después de la incubación, formando un complejo antígeno-anticuerpo. Posteriormente éste se une a la antigammaglobulina humana conjugada (unión covalente) o marcada con cromógenos como el isocianato de fluoresceína, que da lugar a la fluorescencia de color verde manzana si la reacción es positiva. Esta fluorescencia se podrá observar con un microscopio de fluorescencia (LUV).

3.1.2.2.2 Reacción Inmunoenzimática ó “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay” ELISA

La más usada para este tipo de ensayos es la prueba de ELISA indirecta. Su fundamento es la unión del antígeno con el anticuerpo cuando éste se encuentra en el suero del paciente. El antígeno está inmovilizado y pegado a un soporte sólido (microplaca). Se forma un complejo Ag-Ac que es acoplado a una enzima : anti-IgG humana, conjugada con la peroxidasa (o fosfatasa alcalina).

La concentración de la enzima unida al complejo se revela por la acción del sustrato específico para la enzima. El mismo va con un cromógeno para que la reacción sea evidenciada por el color, cuya intensidad es proporcional a la concentración de anticuerpos que se puede medir por su densidad óptica, en un espectrofotómetro especial que es el Lector de ELISA.

Ninguno de estos procedimientos es simple, específico y sensible al mismo tiempo. Los métodos serológicos son más simples y rápidos, aunque existe una relativa complejidad en su ejecución. Normalmente se utilizan extractos proteicos citoplasmáticos y su sensibilidad es elevada, pero su principal desventaja es la baja especificidad (Luquetti, 1990).(29)

El diagnóstico preciso es imprescindible no sólo para evitar la transmisión no vectorial de la enfermedad a través de transfusiones de sangre y de transmisión congénita, sino para hacer el seguimiento de programas de control. La baja parasitemia característica de la fase crónica de la enfermedad genera la necesidad de un diagnóstico altamente sensible y específico. (29)

3.2 HERRAMIENTAS EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN EL LABORATORIO

El método más utilizado para diagnóstico de la Enfermedad de Chagas es ELISA (Enzyme Linked Sorbent Assay) y para optimizarlo en la rutina de diagnóstico de laboratorio, se

buscan constantemente nuevas herramientas base para el mismo, como diferentes tipos de antígenos. En el método de ELISA Convencional se utiliza:

3.2.1 Antígeno convencional: EAE (Extracto Alcalino de Epimastigotes)

Hasta hace poco, los kits comerciales para el diagnóstico serológico de esta enfermedad se basaban sólo en el uso de extractos de *Trypanosoma cruzi*: mezclas de proteínas altamente complejas, extractadas de parásitos enteros o de fracciones del parásito en alguna de sus formas vitales (de los epimastigotes que son las formas no infectivas del parásito, por ello se conoce como EAE: Extracto Antigénico de Epimastigotes) o de proteínas parcialmente purificadas. Este método inmunoenzimático con estos extractos, si bien es bastante sensible, permite detectar las subclases de inmunoglobulinas envueltas en la respuesta inmune direccionada contra el *Trypanosoma cruzi*. Pero, se tenía una considerable variación en la reproducibilidad y confiabilidad de estas pruebas. Las mismas en ocasiones presentan baja especificidad o reacciones cruzadas con pacientes que tienen otras enfermedades así como la Leishmaniasis. (21, 22) De este modo, pueden proporcionar resultados erróneos, falsos positivos o falsos negativos. Por ello, dan muchas reacciones dudosas (no concluyentes) o en el borde del título denominado “Zona Gris”. Además, los antígenos heterogéneos (como lo son los del parásito entero) no hacen diferencia de diagnóstico entre las fases aguda y crónica, y tampoco respecto a las manifestaciones clínicas de la enfermedad.(17). La heterogeneidad antigénica del *Trypanosoma cruzi* causa problemas en el diagnóstico de la enfermedad (22). Por ello, algunos pacientes chagásicos con bajos niveles de anticuerpos anti-*Trypanosoma. cruzi* pueden presentar resultados negativos por la serología convencional.(18).

La forma de epimastigotes del *Trypanosoma cruzi* también es utilizada para realizar improntas para el método de Inmunofluorescencia Indirecta o IFI.

3.2.2 Antígenos obtenidos por Métodos Moleculares (Tecnología Recombinante)

En las dos últimas décadas surgió la aplicación de la tecnología de ADN recombinante

como una alternativa para mejorar el diagnóstico. Mediante esta tecnología se pueden aislar los genes de *T cruzi*. Estos resultados anticiparon la factibilidad de construir genotecas de ADN complementario de *T cruzi* que codifican para las proteínas antigénicas clonándolos en vectores adecuados, luego los expresan en grandes cantidades de antígenos de las formas infectivas en sistemas bacterianos, para detectarlos mediante ensayos inmunoenzimáticos utilizando sueros de ratones o conejos infectados o sueros de pacientes chagásicos. De esta manera se pudieron aislar, purificar y caracterizar antígenos bien definidos y estos eran los antígenos recombinantes(30).

En los últimos años, ésta ha sido una de las estrategias más importantes para intentar mejoras significativas en el diagnóstico específico de la Enfermedad de Chagas. Se evaluaron este tipo de antígenos en el método más adecuado: ELISA y se muestran resultados muy confiables para este diagnóstico (18)

La evaluación de estos antígenos bien definidos muestra que se obtienen sólo el número de determinantes antigénicos que nos interesan. Ya no se tiene la gama de antígenos y de otras moléculas orgánicas (polisacáridos, lípidos, etc.) de un lisado purificado, que interfieren en las reacciones haciéndolas menos específicas. Esto constituye una ventaja pues, si elegimos las proteínas adecuadas, estaremos aumentando la especificidad del sistema al eliminar aquellas moléculas que pueden dar reacción cruzada. Sin embargo, en la obtención de éstos antígenos, existe la desventaja de correr el riesgo de no elegir bien las proteínas y por ello, obtener algunos resultados falsos.

El uso del clonado y purificado de antígenos de *Trypanosoma cruzi*, obtenidos de extractos parasitarios, se constituye en herramienta para el serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas, con propiedades de alta especificidad inmunológica, además de tener la ventaja de su fácil producción. La elaboración de librerías genómicas de *Trypanosoma cruzi*, en base a tripomastigotes, permitió la obtención de antígenos recombinantes de péptidos sintéticos que diferencian la respuesta inmune del paciente chagásico agudo del crónico. Esta nueva estrategia de laboratorio facilita el diagnóstico precoz y diferenciado de la Enfermedad de Chagas, así como del estudio de la evolución de la infección. (18, 21, 22)

Así, Cotrim et al. (1990) y Paranhos et al. (1990) aislaron los clones antigénicos H49 y A13 a partir de una misma genoteca de ADN genómico de tripomastigotes metacíclicos de la cepa G de *T cruzi* utilizando una mezcla de sueros chagásicos para el despistaje.

El antígeno recombinante H49 codifica para una proteína de alto peso molecular (más de 200 kDa) asociada al citoesqueleto del parásito. Esta proteína se expresa en todos los estadios del parásito y en varias cepas de *T cruzi*. Por ello, H49 es reconocido por un alto número de sueros de pacientes chagásicos y no presenta reactividad cruzada con *Leishmania* o *T rangeli*. El péptido H49 purificado también mostró un alto grado de sensibilidad (87%) y una especificidad del 100% cuando fue ensayado por ELISA (30).

Levin et al. (1990) realizaron el despistaje inmunológico de una genoteca de ADN complementario de epimastigotes de la cepa Tulahuen 2, utilizando el suero de un paciente chagásico con un severo daño cardíaco. De esta manera aislaron 5 clones altamente antigénicos y estos fueron los antígenos recombinantes JL1, JL5, JL7, JL8 y JL9.

Por otra parte, al ensayar individualmente el antígeno MAP, vieron que éste era reconocido también por los anticuerpos IgG, pero más por los anticuerpos de la fase aguda de la enfermedad de Chagas, sin embargo, los resultados no siempre son concluyentes. (15, 16)

El antígeno JL 8 presenta 7 repeticiones de los 14 aminoácidos de secuencia similar a la presentada por el antígeno CRA y Miranda 76 de *T. cruzi*. Estas repeticiones muestran la existencia de cambios puntuales de aminoácidos en relación a otras secuencias y le da similitud a secuencias de *Plasmodium malarie*, lo cual explicaría la baja reactividad de este antígeno en forma individual y sus posibles reacciones cruzadas, dando lugar a falsos positivos. (21, 33)

Los antígenos JL 8 y MAP son obtenidos en base a los aminoácidos repetitivos 14 y 38 respectivamente, que son fuertemente conservados en cadenas y aislados de *T. cruzi* (15.17), por ello son buenos aportando la sensibilidad del diagnóstico de los individuos infectados en la fase aguda. Posteriormente realizaron ensayos que demuestran que el antígeno JL 8 también reacciona con los anticuerpos de Inmunoglobulina G (IgG) de

pacientes con la fase crónica de Chagas (17, 29) y mostraron una alta sensibilidad y especificidad para esta fase.

El antígeno MAP fue aislado de una biblioteca de expresión de genes del *Trypanosoma cruzi*, como un clon recombinante que codifica un polipéptido constituido por repeticiones (más de cinco) de 38 aminoácidos dispuestos en tandem, con una secuencia muy parecida al antígeno JL9 y ambos presentan homología con la secuencia que presenta la proteína asociada a los microtúbulos del cerebro de ratón (MAP1B: Microtubule Associated Protein), por ello se dio este nombre a la proteína homóloga aislada por el Dr. Franco da Silveira y colaboradores (1990). Siguiendo estos estudios, se obtuvieron los anticuerpos: anti.JL9 y anti MAP en ratones infectados con *T. cruzi*. (Kerner, N.; Levin, M. J. and Hontebeyrie, J. 1990). La reactividad de la proteína recombinante MAP fue comprobada con sueros de pacientes chagásicos y reaccionó con más del 95% de éstos, revelando un potencial antígeno para el diagnóstico, especialmente de la fase aguda de la enfermedad de Chagas (Umezawa et. Al., 1999).

Estas similitudes en varios de los antígenos recombinantes, llevaron a plantear el uso de mezclas de ellos para potenciar su respuesta. Desde hacen diez a doce años, se fueron evaluando mezclas de antígenos recombinantes que pueden detectar anticuerpos anti-*T. cruzi* más específicos en la mayoría de sueros analizados. La combinación de diferentes antígenos recombinantes y el uso de la moderna tecnología en la detección de inmunocomplejos, abre nuevas posibilidades en la obtención de alta especificidad, con buena sensibilidad y conveniencia en los inmunoensayos para el serodiagnóstico de la Enfermedad de Chagas.(18, 21, 22)

Fue así que se probó la hipótesis que el uso de un cocktail de antígenos recombinantes podía minimizar la variación individual y presentar, además, una alta sensibilidad. Diferentes antígenos complementarios pueden ser combinados en un ensayo inmunoserológico relativamente simple, como es el ELISA y éste se puede llegar a usar para la rutina diagnóstica de la Enfermedad de Chagas. (18, 22)

Por estudios realizados en el Instituto de Ingeniería Genética del proyecto de Biotecnología Iberoamericana para evaluar antígenos recombinantes, verificaron el potencial de varios clones de éstos útiles para el Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas, entre ellos: H49, JL7, JL8, A13, B13, D13, IF8, MAP que son los antígenos más frecuentemente empleados en Sudamérica ya que este proyecto apoya a varios laboratorios de esta región. Ellos sugieren que la principal ventaja, en cuanto al uso de péptidos clonados y otras proteína antigénicas obtenidas por tecnología molecular recombinante, reside en sus propiedades inmunoreactivas de alta especificidad (17).

Si bien en el uso de los antígenos obtenidos en forma convencional de las formas epimastigotes, se consigue alta sensibilidad, la especificidad es baja (promedio de 84%). Por el contrario, las proteínas recombinantes dan una especificidad de valores entre 96,2% (JL8) a 99,6% (A13) por ejemplo. Además, otros estudios muestran una mayor ventaja de los antígenos recombinantes en ELISA para el diagnóstico de Chagas alejando la posibilidad de las reacciones cruzadas con otras enfermedades como la Leishmaniasis (que corresponden a la misma familia taxonómica).

Se probó que varios de los antígenos recombinantes, usados individualmente, reaccionan con más del 90% de los sueros chagásicos crónicos. Sin embargo, ahora se tiene la opción de tomar en cuenta mezclas de estos antígenos, mejorando aún más la especificidad, además de tomar en cuenta determinantes antigénicos adicionales para la obtención de antígenos bien definidos.(21. 22). Se sugiere que la combinación de dos o más antígenos recombinantes puede construir un multi-antígeno para inmunoensayo, mejorando la especificidad en este tipo de ensayos. (18, 22)

3.2.3 Antígeno obtenido por técnicas inmunológicas aplicadas al cultivo celular: TESA

El diagnóstico diferencial de la fase aguda, congénita y crónica de la Enfermedad de Chagas también se puede realizar usando otro antígeno diferente: el obtenido a partir de la forma tripomastigote del parásito, el mismo que se utiliza en diferentes métodos como: ELISA, IFI y Western Blot. (20, 21). Este antígeno, denominado Antígeno de Excreción y

Secreción de Trypomastigotes, es mucho más específico puesto que esta es la forma del parásito que se encuentra en forma activa en el huésped.

El grupo de trabajo de Umezawa realizó estudios importantes en cuanto a caracterización inmunoquímica de antígenos excretados-secretados por las formas de tripomastigotes (formas infectantes de *T. cruzi*), fracción que denominaron TESA (Trypomastigote Excreted-Secreted Antigens), específicamente de la Cepa Y de estas formas. Ese grupo de trabajo verificó que el TESA permitía la discriminación serológica de la fase en la que realmente estaba la enfermedad de Chagas. (21, 22)

TESA es liberado, como exoantígeno, en el sobrenadante de cultivo de células de mamífero LLC-MK2 infectado con tripomastigotes metacíclicos de la cepa Y de *T. cruzi*. (21) Las formas de trypomastigotes del *T. cruzi* excretan y secretan varios antígenos en el sobrenadante de células infectadas en los cultivos in vitro y presentan proteínas que son miembros de la familia transialidasa. Ésta transfiere ácido siálico exógeno al aceptor de moléculas localizado en la superficie de los trypomastigotes, como parte del mecanismo de penetración del parásito, lo cual le da alta especificidad.

A pesar de ser promisorio el uso del inmunoblotting para discriminar fases y dar especificidad al mismo, es difícil con éste realizar un monitoreo y hacer seguimiento serológico de pacientes antes del tratamiento, y durante el mismo. Por ello, se estudiaron estos antígenos aplicados a técnicas más sencillas para desarrollar en rutina de laboratorio: TESA-ELISA, el mismo que muestra también gran sensibilidad y alta especificidad con sueros de pacientes tanto de fase aguda como crónica de la enfermedad. El antígeno para este tipo de ensayo no requiere preparado especial ni purificación y no presenta reacción cruzada especialmente con Leishmaniasis. (22)

El estudio de los antígenos de *T. cruzi*, particularmente de los tripomastigotes que constituyen la forma infectiva del parásito, tiene su fundamento en la búsqueda de moléculas que pudieran estar involucradas en la interacción parásito-hospedador y servir como blanco para una acción quimioterapéutica o inmunológica, y que además pudieran servir como herramienta para el diagnóstico, una de las estrategias más importantes para el control de la enfermedad de Chagas. Estos antígenos, diferentes a los tradicionales, se

obtienen de la forma trypomastigote con proteínas de regiones más propias del parásito, el *Trypanosoma cruzi*. Son antígenos de superficie que justamente provienen del estadio del parásito involucrado en la respuesta inmune protectora.

3.3 SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD EN INMUNOENSAYOS.

Algunos de los parámetros para describir la utilidad de una prueba son: la SENSIBILIDAD, la ESPECIFICIDAD, el ÍNDICE DE SENSIBILIDAD, el ÍNDICE DE ESPECIFICIDAD, la EFICIENCIA y el cálculo de los VALORES PREDICTIVOS.

La **validez** de una Prueba Diagnóstica se da principalmente por la **sensibilidad** y la **especificidad**, ya que éstas son las medidas tradicionales y básicas del valor diagnóstico de una prueba (24, 25). Miden la discriminación diagnóstica de una prueba en relación a un criterio de referencia, que se considera “la verdad”, de este modo, se utiliza para ello una prueba de referencia o “Gold Standard”.

El cálculo de la sensibilidad y la especificidad (entre otros) se realiza como Índices de Diagnóstico. (24, 25). Estos indicadores permiten comparar directamente la eficacia de una prueba con la de otras y esperar resultados similares cuando son aplicadas en diferentes regiones o ámbitos.(29)

3.3.1 SENSIBILIDAD. El significado de sensibilidad abarca dos aspectos algo diferentes:

- Sensibilidad Analítica: Es la capacidad de una prueba de detectar muy bajas concentraciones (cantidades muy pequeñas) del elemento o analito que se busca (antígeno o anticuerpo). La sensibilidad se define por la mínima cantidad de Ag o Ac que la técnica detecte. Los métodos más sensibles son los capaces de detectar menores concentraciones del componente estudiado.
- Sensibilidad Epidemiológica: Es la habilidad de una prueba para identificar los casos positivos (ausencia de falsos negativos). Por ello, también se dice que es la probabilidad de que una prueba resulte positiva si se aplica a pacientes que sí tengan la enfermedad en cuestión. El método más sensible es aquél que indica un resultado positivo cuando el verdadero estado de la muestra es positivo.

El método es idealmente sensible cuando indica un resultado positivo cuando el verdadero estado de la muestra es positivo. Cuando la prueba resulta negativa si la muestra es en verdad positiva, se dice que es Falso Negativo.

$$\text{SENSIBILIDAD} = \frac{\text{VERDADEROS -POSITIVOS}}{\text{VERDADEROS -POSITIVOS} + \text{FALSO-NEGATIVOS}}$$

$$\text{INDICE DE SENSIBILIDAD} = \frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{Falsos negativos}} \times 100$$

3.3.2 ESPECIFICIDAD. Es la capacidad de una prueba para identificar correctamente a todos los negativos (anulando los falsos positivos).

Discrimina los negativos verdaderos, o sea que debe producir un resultado negativo cuando el verdadero estado de la muestra es negativo, o sea, la prueba debe ser negativa en casos de personas sanas.

En este concepto se tiene el supuesto de que ninguno de los falsos positivos contiene el componente que se investiga. Si las muestras que son verdaderamente negativas reaccionan positivamente al aplicar la prueba, se designan como Falsos Positivos.

Si las muestras falsas positivas reaccionan dando resultados positivos como consecuencia de la acción de variables fuera de control, tales como pH, o debido a la presencia de componentes extra en los sueros o reactivos, que pueden confundir al sistema indicador. Por lo común, se incluyen en la prueba una muestra “control verdadera negativa”, a fin de detectar la acción de variables fuera de control.

$$\text{ESPECIFICIDAD} = \frac{\text{VERDADEROS-NEGATIVOS}}{\text{VERDADEROS-NEGATIVOS} + \text{FALSOS POSITIVO}}$$

$$\text{ÍNDICE DE ESPECIFICIDAD} = \frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Verdaderos Negativos} + \text{Falsos positivos}} \times 100$$

Sensibilidad y especificidad son medidas de discriminación inherentes a una prueba cuando ésta se compara con un estándar de referencia y no cambian aún si la enfermedad es rara o frecuente: son cualidades de la prueba.(29)

Para definir estos criterios es necesario aplicar la comparación de los resultados obtenidos con la nueva herramienta de diagnóstico. con aquellos obtenidos al usar la mejor prueba conocida hasta el momento como referencia, a la cual se denomina genéricamente como Prueba “Gold Standard” o Prueba Estándar de Oro.(24, 25)

3.3.3 EFICIENCIA.

La eficiencia de una prueba tiene que ver con la habilidad de detectar correctamente todos los verdaderos positivos y todos los verdaderos negativos (por ello, la ausencia de falsos positivos y de falsos negativos).

Es una combinación de la sensibilidad y de la especificidad de una prueba. Da una idea de la aptitud de eficacia de la prueba. Se determina como sigue:

$$\text{EFICIENCIA} = \frac{\text{Verdaderos Positivos} + \text{Verdaderos Negativos}}{\text{Verdad. Posit.} + \text{Falsos Posit.} + \text{Verdad. Neg.} + \text{Falsos Neg.}}$$

3.3.4 VALORES PREDICTIVOS.

Los valores predictivos son índices estadísticos básicos que, junto a los parámetros anteriores (sensibilidad y especificidad) evalúan el desempeño de una prueba diagnóstica. Estos indicadores determinan la seguridad de dicha prueba. Describen el valor de las pruebas tomando en cuenta la presencia o ausencia de la enfermedad. Ante un resultado positivo o negativo, muestra la probabilidad de la presencia o ausencia de la enfermedad (respectivamente). El valor de una prueba puede no depender de su sensibilidad y su especificidad, sino más bien de la población analizada. (24, 25). Se tienen:

- **El Valor Predictivo Positivo (VPP)**, éste se define como la frecuencia de individuos infectados entre todas las personas con resultados positivos. Da la probabilidad de acertar si existe la enfermedad cuando en el test se obtiene un resultado positivo.
- **El Valor Predictivo Negativo (VPN)** que es la frecuencia de individuos no infectados entre todas las personas con resultados negativos. Da la probabilidad de acertar si el sujeto está sano (no hay enfermedad) cuando en el test se obtiene un resultado negativo.

Tabla 2 x 2 para Valores Predictivos

	E (+)	E	
T (+)	VP	FP	VP + FP
T (-)	FN	VN	FN + VN
	VP + FN	FP + VN	Nº TOTAL

Los Valores Predictivos se calculan así:

VERDADEROS POSITIVOS
VPP = ----- X 100
VERDADEROS POSITIVOS + FALSOS POSITIVOS

VERDADEROS NEGATIVOS

$$\text{VPN} = \frac{\text{VERDADEROS NEGATIVOS}}{\text{VERDADEROS NEGATIVOS} + \text{FALSOS NEGATIVOS}} \times 100$$

VERDADEROS NEGATIVOS + FALSOS NEGATIVOS

3.4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Un Problema persistente con los análisis de laboratorio actuales es la poca especificidad de los métodos y esto se debe al tipo de antígenos utilizados, los mismos que puedan dar resultados no concluyentes debido a las reacciones cruzadas, especialmente de los epítopes similares de otros parásitos de la gran familia *Tripanosomidae*.

Actualmente los métodos convencionales empleados en el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas, son relativamente útiles, sin embargo no sirven como instrumentos discriminativos de diagnóstico, lo que se necesita para un buen control epidemiológico y para lograr un seguimiento apropiado en el tratamiento de los pacientes seropositivos para *Typanosoma cruzi*.

La mayoría de los antígenos usados en los métodos tradicionales, dan problema de reacciones cruzadas y presentan resultados no concluyentes, lo cual no permite el tratamiento efectivo del paciente, en especial de las mujeres embarazadas que tienen la enfermedad y que, de otro modo, tendría un producto de gestación con infección congénita. También constituyen un problema los diagnósticos no concluyentes o de falsos positivos o negativos en el caso de las transfusiones sanguíneas, en los Bancos de Sangre del país.

Estos interferentes de diagnóstico en los antígenos de los métodos convencionales se dan porque se obtienen de la forma epimastigote del parásito, que no es la forma infectiva en el huésped humano, por ello, esos métodos y sus antígenos no discriminan el estado en el que se encuentra el paciente infectado, lo cual es importante para definir un caso.

Desde este punto de vista, surge una interrogante central:

¿La evaluación de nuevas herramientas moleculares e inmunológicas, logrará el fortalecimiento del diagnóstico de la enfermedad de Chagas?

4. JUSTIFICACIÓN.

En la situación de incertidumbre que se plantea en ocasiones en el diagnóstico certero de la enfermedad de Chagas, surge la necesidad del uso de diferentes antígenos a los convencionales, como lo son los antígenos recombinantes en mezcla, lo cual aumenta su sensibilidad y especificidad con relación a su uso en forma individual.

Otro antígeno que está dando buenos resultados es el obtenido de la otra forma evolutiva del *Trypanosoma cruzi*, el trypomastigote, por lo cual brinda mejores sensibilidad y especificidad juntas por provenir de la forma que se encuentra en el huésped humano. La evaluación de otros antígenos diferentes a los clásicos, que da paso a esta investigación, dará mayores oportunidades de brindar resultados más certeros para un buen seguimiento de la epidemiología de la Enfermedad de Chagas en nuestro país.

Los métodos convencionales empleados en la actualidad en el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas, son relativamente útiles, sin embargo no sirven como instrumentos discriminativos de diagnóstico. Es importante contar con un diagnóstico que discrimine el estado en el que se encuentra el paciente infectado por *T. cruzi*, para realizar un tratamiento apropiado. En un laboratorio de diagnóstico de la Enfermedad de Chagas se debe contar siempre con un método que determine en forma específica la fase en la que se encuentra el paciente chagásico, para que el médico realice el tratamiento adecuado según los resultados, permitiéndole, además, hacer un seguimiento específico que le permita ver la seroconversión para verificar la efectividad del mismo. La selección adecuada del método que brinde más especificidad y también una buena sensibilidad, nos debe dar a la vez, reproducibilidad en los resultados de un mismo paciente.

Por otra parte, los métodos de producción de antígenos para las pruebas convencionales que se utilizan en rutina del laboratorio hoy en día, son de alto riesgo para la salud de los operadores, siendo además morosos y por ello de alto costo. En cambio, la producción de antígenos recombinantes disminuye riesgos de operación, puesto que se manipula ADN del parásito y llega a disminuir su costo debido a que la producción masiva del ADN de interés se realiza en cultivos de bacterias (*E. coli*), cuyos requerimientos de crecimiento son mínimos.

Asimismo, es recomendable, en cada región, realizar la producción de antígenos propios a partir de cepas nativas para elevar especificidad, pues cuando se trabajan con antígenos de cepas foráneas, se corre el riesgo de que éstos tengan un comportamiento diferente al momento de reaccionar con los anticuerpos específicos presentes en la sangre de los pacientes, debido a la gran variabilidad del *T. cruzi*, dando lugar a posibles reacciones cruzadas y, por tanto, falsos positivos, o por el contrario, falsos negativos.

Si bien la producción de antígenos recombinantes es ventajosa en varios aspectos, su uso en forma individual a veces no da la especificidad y sensibilidad esperadas, (JL 8, A13)(17-Umezawa, 30-Abate). Con el fin de lograr resultados con alta sensibilidad y especificidad, se plantea el uso de Antígenos Recombinantes mezclados (en cocktail o mix).

Por otra parte, se plantea evaluar el antígeno soluble de Excreción y Secreción de Trypomastigotes (TESA) como método de diagnóstico diferencial de fase aguda, el mismo que además es útil para realizar un eficiente seguimiento de tratamiento (Umezawa 2001) Constituye una de las técnicas innovadoras de diagnóstico. Esto sería algo productivo para esta área de servicios al paciente y para el otro puntal del Instituto SELADIS, que es la enseñanza práctica y dinámica en el trabajo diario del laboratorio.

4.1 Marco Institucional.

El Instituto SELADIS es una entidad que entre los puntales de sus actividades tiene tres líneas de acción: la interacción social, la enseñanza y la investigación. En el área de interacción social, ofrece pruebas de diagnóstico de rutina y otras especializadas en diferentes áreas, siendo una de ellas la serológica. Estos se basan en los resultados y experiencias resultantes de la investigación. Por ello, es muy importante para el área de Parasitología del Instituto, desarrollar métodos innovadores como el uso de Antígenos recombinantes y el antígeno TESA.

4.2 Finalidad.

Se pretende lograr dos tipos de impacto con el presente Trabajo Dirigido:

4.1.1 Impacto de los resultados en el aspecto académico.

- Fortalecimiento de la formación de profesionales capacitados tanto en el manejo del diagnóstico convencional como en el uso de instrumentos moleculares e inmunológicos (incluyendo cultivos celulares), diferentes técnicas innovadoras, de modo específico para la enfermedad de Chagas.
- Fortalecimiento en la formación de investigadores en el área de salud, especialmente enfocados al estudio de enfermedades tropicales que más afectan al país.
- Ampliar los conocimientos de tipo académico intelectual en las áreas de Parasitología, Biología Molecular y otras afines
- Lograr la innovación tecnológica en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas utilizando instrumentos moleculares e inmunoserológicas planteadas en el presente trabajo, para poner a disponibilidad de los estudiantes y profesionales del área, tecnologías que puedan ser aplicadas para el control de la Enfermedad de Chagas.

4.1.2 Impacto de los resultados en la comunidad.

- El empleo de antígenos recombinantes en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas puede diferenciar la fase en la que se encuentra la enfermedad (aguda o crónica) más claramente, siendo esto de gran utilidad para su correcto tratamiento.
- El trabajo permitirá dar pautas para efectuar un mejor control de la enfermedad de Chagas, Se podrán aplicar métodos más específicos que discriminen la enfermedad de Chagas con relación a otras entidades, como la Leishmaniasis (por ejemplo), porque existe riesgo al aplicar el tratamiento para ésta si el paciente ya presentara daños cardiacos por la enfermedad de Chagas, especialmente si se dan casos de infecciones mixtas.
- Los resultados obtenidos en las poblaciones estudiadas de zonas endémicas servirán de base para promover otros estudios en estas y otras zonas que permitan mejorar la vigilancia y control de esta enfermedad.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar herramientas moleculares e inmunológicas para el fortalecimiento del Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas

5.2 Objetivos Específicos

- 5.2.1** Optimizar la técnica convencional ELISA con EAE (Extracto Antigénico de Epimastigotes) como herramienta principal de apoyo al diagnóstico de la enfermedad de Chagas.
- 5.2.2** Valorar la reactividad de los Antígenos Recombinantes H49, JL8, individualmente.
- 5.2.3** Valorar la reactividad de los antígenos recombinantes H49, JL8 y MAP mezclados (Mix)
- 5.2.4** Valorar la reactividad del Antígeno TESA (Antígeno de Excreción y Secreción de Trypomastigotes)
- 5.2.5** Determinar la sensibilidad, especificidad y eficiencia de los métodos utilizados.
- 5.2.6** Determinar los Valores Predictivos para cada técnica empleada.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 DISEÑO METODOLÓGICO

Es un Diseño de Prueba Diagnóstica.

6.1.1 Población.

Se estudiaron pacientes adultos, entre 18 y 65 años de edad, con diagnóstico presuntivo de enfermedad de Chagas, provenientes de una zona endémica de Bolivia, como es el cantón Carrasco y alrededores, en la provincia de Caranavi (Nor-Yungas), a 162,78 Km de la ciudad de La Paz, con una altitud media de 1 930 m/snm.



Este cantón de Caranavi, contaba con una población de 4 402 habitantes, la cual constituye la población universo. Estos datos se obtuvieron del informe del Censo del año 2001 del Instituto Nacional de Estadística (INE), y seguían vigentes el año 2002, en el que se realizó la colecta de muestra a la población seleccionada para el efecto.

El trabajo se desarrolló en el marco de un proyecto mayor financiado por la “Internacional Atomic Energy Agency” (IAEA – Viena, Austria) que titulaba “Nuevas estrategias para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas”, iniciado en Enero del año 2001 y que concluyó en Diciembre del año 2002. Este año se llevaron los sueros al Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, Brasil, para hacer una parte de la evaluación en sus recintos. Del proyecto grande, se derivaron varios trabajos, entre ellos varias evaluaciones

de diferentes antígenos recombinantes principalmente, para todos los cuales se utilizaron muestras comunes, de la misma área y grupo de estudio. En la toma de muestra fue casi imposible lograr la aceptación del “Consentimiento informado” porque la población no tenía confianza del destino de sus firmas.

Se tuvieron reuniones con el grupo de personas susceptibles de participar en el estudio y se les indicó que se les entregaría los resultados de laboratorio correspondientes a cada uno de ellos, para que, a partir de ello, aquellos que se confirmara con los diferentes métodos que tienen la enfermedad de Chagas, recibirían tratamiento con Benzonidazol en dosis de 3 a 10 mg/Kg/día (disponible por el proyecto para el efecto). La duración del tratamiento sería de 30 días para aquellos a quienes se detectara la fase aguda y de 60 días para la etapa crónica. Posteriormente, se realizaría un estudio “control” después de un año, para verificar la curación. Los criterios de curación etiológica se basan en la negativización parasitológica y en la seroconversión.

Después de explicarles todo lo anterior y con el compromiso del personal del proyecto, se realizaron las respectivas tomas de muestras, como se detalla más adelante. Los resultados de cada paciente fueron entregados en el plazo de tres meses, una vez verificados todos los datos correspondientes.

Tamaño Muestral.

Se calculó el mismo de acuerdo al tipo de estudio (Prueba Diagnóstica). Se consideró un muestreo de acuerdo a criterios de inclusión y exclusión fijados. En el cálculo se tomó en cuenta el Error Alfa ó Z que es el Nivel de Confianza, también se asignó el grado de error máximo aceptable (e) o precisión en los resultados de la investigación. Este error puede ser máximo de un 10%, de acuerdo al nivel de confianza esperado (ya que variaciones superiores al 10% reducen la validez de los mismos).

Se utilizó la siguiente fórmula para el cálculo de tamaño muestral (para una población finita)

$$n = \frac{Z^2 (p \times q) N}{(N e^2) + Z^2 (p \times q)}$$

Donde:

N = Universo o población general

Z = Nivel de Confianza

e = Error de estimación o Precisión (< 10%)

n = Tamaño muestral

p = Probabilidad a favor (50% = 0.5)

q = Probabilidad en contra (del 50%, entonces 1 – 0.5)

Se planteó un nivel de confianza mayor a 90%, específicamente 91%. Convencionalmente se tienen valores para cada nivel de confianza asignado; así, el valor correspondiente a 91% elegido es de **1.69**.

Al aceptar un valor de **Z = 91%**, el valor de (e) sería 100%-91% = 9%, de este modo, el error de estimación **e =0.09**.

En todo fenómeno estudiado se debe considerar la probabilidad (que se denomina “p”) de que ocurra el evento, pero existe la misma probabilidad de que el evento no se realice (a lo cual se nombra “q”). Como ambas probabilidades tienen la misma proporción, se da el valor de 50% a cada una de ellas. Por ello, la probabilidad “a favor” es del 50% (p=0.5) . Para cálculos matemáticos, se toma en consideración que la suma de ambos valores (p + q) siempre será igual a uno: $p + q = 1$. De este modo, la probabilidad “en contra”, que es también del 50% será: $q = 1 - 0.5 = 0.5$.

Con los datos que se obtuvieron y los parámetros que se establecieron para la confianza del desarrollo de este trabajo (nivel de confianza, grado de precisión y de error), el cálculo del tamaño muestral resulta así:

N = 4 402	e = 0.09
Z = 91% = 1.69	e ² =0.0081
Z ² = 2.86	

$n = \frac{2.86 \times (0.5 \times 0.5) \times 4\,402}{(4\,402 \times 0.0081) + (2.86)(0.5 \times 0.5)} = \frac{3147.43}{36.375} = 86.53$

Entonces, el tamaño muestral que se debe considerar para su estudio en el presente trabajo es mínimo de **86** pacientes.

Para la selección de personas cuyas muestras serían evaluadas, se tomaron en cuenta los siguientes Criterios de Inclusión y Exclusión:

Criterios de Inclusión.-

- Ser adulto igual o mayor de 18 años y menor de 66 años.
- Ser residente de la zona elegida en los últimos 5 años.
- Haber tenido un diagnóstico presuntivo (otorgado por un médico) de enfermedad de Chagas.
- Tener conocimiento que en su vivienda habían vinchucas.
- No tener hábito de tabaco (para descartar otro daño respiratorio-cardíaco)
- No tener reumatismo ni tuberculosis como enfermedades declaradas. (Por la posibilidad de reacciones cruzadas).

Criterios de Exclusión.-

- Ser menor o mayor a las edades fijadas previamente en el trabajo (18 – 65 años).
- No tener residencia fija durante los últimos cinco años en la localidad elegida.
- No haber concurrido al médico en los últimos meses con sospecha de tener Chagas.
- Tener hábito de tabaco muy arraigado.
- Tener reumatismo o tuberculosis evidenciados con diagnóstico médico. (Por acentuar reacciones cruzadas).

Con estos criterios se empezó a realizar la evaluación en 104 muestras, sin embargo fueron excluidas 14 muestras por causas técnicas como: hemólisis, lipemia acentuada y ruptura de

tubos en trabajo de campo. De este modo, se realizó la evaluación de 90 muestras.

Obtención de la muestra. Se realizó la toma de 5 ml. de sangre venosa en un tubo vacutainer sin anticoagulante de la cual se obtuvo el suero por centrifugación. Los sueros, una vez separados, se mezclaron con glicerina en una relación 1:1 para su adecuada preservación a 4°C hasta su procesamiento. (Los sueros debidamente preparados con glicerina pueden ser almacenados hasta por 5 a 10 años, a una temperatura de – 20°C)

6.1.2 Metodología. Según la etapa del trabajo, se aplicaron Técnicas Convencionales y Técnicas Inmunomoleculares.

6.1.2.1 TÉCNICAS CONVENCIONALES.

Todas las muestras fueron primero analizadas por el inmunoensayo ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) e IFI (Inmunofluorescencia Indirecta), utilizando antígenos convencionales. Las dos pruebas constituyeron el Gold Standard compuesto.

- **Técnica de ELISA con EAE (Extracto alcalino de epimastigotes)** Esta técnica utiliza extractos alcalinos de epimastigotes como antígeno soluble para la detección de Anticuerpos tipo IgG anti *T. cruzi*.

El antígeno fue obtenido a partir de cultivos masivos de epimastigotes de la cepa “Y” de *Trypanosoma cruzi*, los mismos que se aislaron a partir de ratones y crecieron en un medio líquido: LIT (Liver Infusion Tryptose). Los epimastigotes se prepararon por el método de extracción alcalina (por ello su nombre: EAE). Se lavaron 5 veces con solución de Hanks Wallace. El sedimento se recuperó por centrifugación a 3500 r.p.m. por 15 minutos y se incubó en solución de NaOH 0.3 M por 18 horas a 4°C. Posteriormente, se neutralizó el preparado con HCl 0.3 M hasta alcanzar el pH de 7.2. El lisado celular se centrifugó por 1 minuto a 8000 r.p.m., para después recuperar el sobrenadante y realizar la dosificación de proteínas por el método de Rojo Ponceau. Una vez determinada la concentración de proteínas, se homogenizó todo lo obtenido, se alicuotó y congeló a -70°C hasta su uso. El

producto resultante de este procedimiento es un extracto soluble de epimastigotes enteros. Fue realizado en base a protocolos de Umezawa et.al.1999 (34).

a) Preparación de placas de ELISA: Fase de pegado del antígeno (**Coating**) al soporte de las microplacas nuevas de polietileno, de 96 pozos. En cada pozo se colocaron 50 ul de extracto alcalino (0.55 mg/ml de concentración) diluido 1/100 en tampón carbonato/bicarbonato 0.05 M, de pH 9.6.m Se incubaron las placas a 37°C por 2 horas para luego dejarlas a 4°C cubiertas con parafilm toda la noche:“overnight”.

Pasada la incubación, se lavaron 5 veces las placas con PBS de pH 7.2, bloqueando la reacción con 70 ul de leche Mólico (o albúmina) al 5%, diluida en PBS-Tween 20 (0.05%), por pozo. Luego se incubaron las microplacas durante 30 minutos .a temperatura ambiente, terminando el procedimiento con 5 lavados con PBS de pH 7.2.

b) Reacción con el suero: se procedió a colocar 50 ul de suero diluido en PBS pH 7.2 con 1% de leche descremada. (Dilución 1/200). Las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C y después se lavaron las placas 5 veces con PBS pH 7.2 al 0.05% - Tween 20. Luego se colocó en cada pozo el conjugado diluido (1/6000) en PBS pH 7.2. (El conjugado utilizado fue Anti-IgG humana unido a la enzima peroxidasa). Se incubaron las placas durante 1 hora a 37°C y al cabo de este tiempo, se lavaron las mismas nuevamente por 5 veces con PBS pH 7.2-Tween 20.

La reacción se reveló con el sustrato específico unido a un cromógeno: Agua Oxigenada con 50 ul de Ortophenilendiamina (.OPD). Se dejó actuar para el desarrollo del color durante 30 minutos a 37°C parando la reacción con 25 ul de H Cl 6N. La lectura de la Densidad Óptica (D.O.) fue realizada con un Lector de ELISA, marca SIGMA Diagnostics (EIA Microplate Reader) a una absorbancia de 492 nm..

Las muestras de suero y los controles fueron analizadas por triplicado. Se escogió el valor intermedio, cuando los valores dieron muy cercanos, caso contrario, se invalidaron los mismos.

El valor de corte (Cut-Off) fue determinado sacando el promedio de las densidades ópticas de cada uno de los valores negativos obtenidos al procesar los sueros. Se sacó el promedio de las D.O. de todos estos valores. Se calculó la desviación standard de este valor y se tomaron en cuenta +/- 2 DS desde el promedio. Estos valores dan la correspondiente “Zona Gris”, que incluye el valor de corte. Los valores mayores a +2DS se consideraron positivos y los valores menores a -2DS, se consideraron negativos.

El cálculo del Cut-Off resulta de:

$$\text{Promedio} = \mu = \frac{\Sigma X}{N}$$

$$DS = \sqrt{\frac{\Sigma(\mu - X)^2}{N}}$$

Donde: X = Valor de la densidad óptica
 μ = Valor de los promedios
 Σ = Sumatoria
 DS = Desviación Stándard
 N = Número total de valores

➤ **Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)**

Con el fin de coadyuvar con la técnica de ELISA convencional para Gold Standard compuesto en la selección de muestras, se utilizó la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (Camargo et. al. 1999)

Esta técnica utiliza epimastigotes enteros fijados a portaobjetos, constituyéndose en antígeno de superficie.

a) Preparación de antígeno. Se procede a realizar la impronta de parásitos en el portaobjetos especial con pozos, para lo cual se centrifugó 20 ml de cultivo de epimastigotes a 3000 rpm durante 10 minutos, trabajando sobre hielo. Se lavó por 3 veces con solución de Hanks Wallace, centrifugando cada vez por 10 minutos a 3000 rpm. Después del último lavado, se añadió 2 ml de PBS de pH 7.4 y 50 ml de glutaraldehído al 2.5% dejando en reposo por 10 minutos. Luego se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos para luego desechar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 1 ml de PBS pH 7.4. Se verificó la concentración de parásitos por campo microscópico a 40X de aumento después

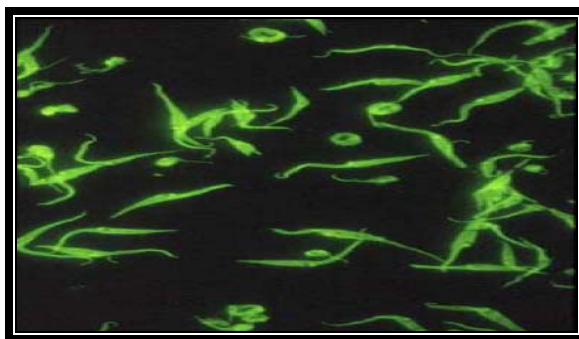
de romper las rosetas por adsorción y resorción con jeringa de insulina. Se realizaron varias diluciones hasta llegar a una concentración de 20 a 30 parásitos por campo. De esta solución se depositó 50 ul en cada pocito del portaobjetos. Luego, se adsorbió el excedente de líquido de cada pozo (dejando una película fina sobre el mismo). Se dejaron secar por 10 a 15 minutos. Las improntas se almacenaron en refrigeración (-20°C) hasta su uso.

b) Reacción con el suero: se prepararon cinco (5) diluciones de los sueros en PBS pH 7.4 de acuerdo al siguiente orden:

Dilución del suero	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
PBS (ph 7.4)	450	200	200	200	200
Suero	30	200	200	200	200

Luego se depositó 50 ul de cada dilución del suero en cada pozo según protocolo pre-diseñado. Las placas fueron incubadas en cámara húmeda por 30 minutos a temperatura ambiente pasados los cuales se procedió al lavado de placas por 3 veces. Cada lavado por 10 minutos con PBS de pH 7.4 en agitación constante y homogénea.

Se añadió el conjugado (Anti IgG humana) marcado con fluoresceína, diluido 1/200 en Azul de Evans 1/7500 y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después se procedió a un nuevo lavado por 3 veces y sobre los portaobjetos secos se colocó una gota de glicerina al 50% en cada extremos de ellas y se colocó suavemente el cubreobjetos encima. Se observaron las placas al microscopio de inmunofluorescencia (con LUV) utilizando aumento de 40X.



6.1.2.2 TÉCNICAS INMUNOMOLECULARES

Están constituidas por aquellas en las cuales el antígeno fue producido por clonado molecular o tecnología del DNA Recombinante (H49 y JL8). También incluyen aquellas cuyo antígeno se produce a partir de cultivos celulares, como el antígeno de excreción y secreción de trypomastigotes (TESA)

➤ **ELISA con Antígenos Recombinantes**

Se evaluaron los Antígenos Recombinantes: Ag Rb H49 y JL8, en forma individual y en forma mezclada.

Los antígenos recombinantes H49 y JL8 fueron producidos por clonado molecular en el Laboratorio de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, Brasil (Umezawa et.al.1998) y el INGEBI (Instituto de Genética y Biología Molecular) de Buenos Aires, Argentina (Levin et. al. 1998).

Se partió de una concentración base de 20 ng/ml de antígeno H 49 y 100 ng/ml de JL 8. De este modo se realizó una dilución previa al proceso de 1/100 para H 49 y 1/200 para JL 8, en tampón carbonato-bicarbonato 0.1 M pH 9.6.

En el caso de la mezcla de antígenos recombinantes, para el Ag Rb H 49 se realizó una dilución 1/2500 (2 ul en 5 ml de tampón carbonato-bicarbonato 0.05 M de pH 9.6). Se parte de una concentración de 60 ng/ml. Se agregan 4ul del Ag Rb JL 8, dilución 1/1250 (partiendo de una concentración de 100 ng/ml) y luego se añade 5 ul del Ag Rb MAP, dilución 1/1000 (que parte de la concentración de 100 ng/ml).

a) Preparación de placas de ELISA: Fase de pegado del antígeno (**Coating**). Se utilizaron microplacas nuevas de polietileno (de 96 pozos) En cada pozo se colocaron 50 ul del antígeno diluido. Las placas con el suero se incubaron a 37°C por 1 hora y 30 minutos. Después se dejaron las placas a 4°C cubiertas con parafilm toda la noche u“overnight”. Pasada la incubación, se realizaron 3 lavados de las placas con PBS-Tween de pH 7.2 a

ritmo moderado durante 5 minutos. por vez. Luego se bloqueó la reacción con 50 ul de leche (o albúmina) al 5%, diluida en PBS-Tween 20 (0.05%), por pozo. Las microplacas se incubaron durante 1 hora y 30 minutos a 37°C. Pasado este tiempo, se lavaron las placas 3 veces con PBS-Tween de pH 7.2.

b) **Reacción con el suero**, se siguieron los mismos pasos de un ELISA convencional: se prepararon los controles positivos, negativos y sueros de pacientes, realizando una dilución de 1/100 con PBS-T leche al 3%. Se colocó 50 ul /pozo de esta dilución. Las placas se incubaron durante 2 horas a 37°C, pasadas las cuales se lavaron las placas (x 5 veces) con PBS 0.05% - Tween 20.

Después se preparó el conjugado (Anti-IgG humana unido a la enzima peroxidasa) con una dilución 1/2500 con PBS-T leche al 3%. Se colocó 50 ul/pozo de esta dilución, llevando las placas a incubación durante 1 hora a 37°C. Al cabo de este tiempo, se lavaron las placas nuevamente (x 3 veces) con PBS-Tween 20. La reacción se reveló con el sustrato específico unido a un cromógeno (5 mg de OPD (Ortophenilendiamina) en 7 ml de tampón citrato 0.1 M de pH 5.7, junto a 7 ul de peróxido de hidrógeno al 30%), colocando 50 ul/pozo. Se dejó actuar para el desarrollo del color durante 20 minutos a temperatura ambiente en ausencia de luz. Se paró la reacción con un ácido fuerte: 25 ul de H Cl 6N, para proceder a la lectura en Lector de ELISA, a una absorbancia de 492 nm.

En el caso de los antígenos recombinantes individuales, las muestras de suero y los controles fueron analizadas por triplicado, cuyo procedimiento fue el mismo que para el ELISA-EAE.

En el mezclado de los antígenos recombinantes, las pruebas de ELISA se realizaron por duplicado y se volvieron a realizar en las mismas condiciones una próxima vez (otro día) para ver la reproducibilidad. El procedimiento del Cut-Off fue el mismo que para el ELISA-EAE.

➤ **ELISA con Antígeno TESA**

Para evaluación del antígeno de excreción y secreción de trypomastigotes de *T. cruzi*, se aplicó el inmunoensayo enzimático ELISA.

De acuerdo a investigaciones previas (21, 26) se precisan diluciones menores o iguales a 1:160 para mejor discriminación entre sueros positivos y negativos. El antígeno TESA (Antígeno de Excreción y Secreción de la forma trypomastigote de *T. cruzi*) fue obtenido en base a cultivo de la forma trypomastigote del parásito según metodología descrita por investigadores pioneros en la misma (20, 21). El medio de cultivo, conteniendo los antígenos excretados y secretados por el parásito, fue centrifugado a 2 800 g por 10 minutos a 4°C, tratado con inhibidores de proteasas, filtrado a través de una membrana de acetato de celulosa con poro de medida: 0.22 μm . Una vez determinada la concentración de proteínas del antígeno TESA, que fue de 40 $\mu\text{g/ml}$., se alicuotó y congeló a -70°C hasta su uso. (Procedimiento realizado en el Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, Brasil).

a) **Preparación de placas de ELISA** (fase del **Coating** o pegado al soporte). Se utilizaron microplacas nuevas de polietileno de 96 pozos. Éstas se sensibilizaron colocando en cada pozo: 100 μl del antígeno diluido en tampón carbonato-bicarbonato pH 9.6. Se parte de una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}^{-1}$.

Las placas se incubaron por 1 hora a 37°C. Después se dejaron las placas a 4°C cubiertas con parafilm toda la noche o por un mínimo de 12 Hrs. Pasada la incubación, se descartó el sobrenadante de los pozos y luego se sometió a bloqueo (con 200 μl /pozo) durante 2 horas a 37°C con PBS 0.01 M (pH 7.2)-0.05% de Tween 20 (PBS-T) y 1% de BSA conteniendo 5% de leche descremada. Después se realizaron 10 lavados de las placas con PBS-Tween de pH 7.2, a ritmo moderado durante 5 minutos por vez.

b) **Reacción con el suero**. Se siguieron los pasos clásicos de un ELISA, utilizando diluciones del suero predeterminadas por pasos de titulación previos.

Se colocaron las muestras de suero, 100 μl /pozo, diluidas 1/200 en PBS-T conteniendo 1% de leche descremada. Se incubaron por 1 hora a 37°C. Después de la incubación, se lavaron las placas con PBS-Tween de pH 7.2. Una vez lavadas las placas, se realizó el contacto con

el conjugado (anti-IgG humana con peroxidasa) 1/1000 diluido en PBS y se procedió a la incubación a 37°C por 1 hora y 30 min. Luego de incubar, las placas fueron lavadas nuevamente como en el paso anterior, con PBS-Tween de pH 7.2. y se realizó el paso de revelado de los inmunocomplejos al añadir peróxido de hidrógeno con una solución de OPD : 100 ul/pozo. Se dejó en incubación 10 minutos a 37°C en ausencia de luz. La reacción fue detenida con H Cl 4 N (50 ul/pozo)y se midió la absorbancia a 492 nm.

Las corridas se realizaron por duplicado y se volvieron a ejecutar en las mismas condiciones una próxima vez, para ver reproducibilidad. El procedimiento del Cut-Off fue el mismo que para el ELISA-EAE.

6.1.3 ANÁLISIS DE DATOS

6.1.3.1 Cálculo de Sensibilidad y Especificidad.

Para determinar la sensibilidad y especificidad del ELISA se empleó la llamada **Tabla de 2 x 2**. Esta consiste en dos columnas (verticales) que representan la presencia o ausencia de la infección por *T. cruzi*, y dos filas (horizontales) que representan los resultados positivos o negativos del test. En base a esta tabla surge lo que se llama la Tabla de Criterio de Verdad.

Cálculo de Sensibilidad y Especificidad empleando el Criterio de Verdad (Test-Dx)

		CRITERIO DE VERDAD		
		Enfermos	No Enfermos	Total
ELISA PARA CHAGAS	Positivos	a	b	a + b
	Negativos	c	d	c + d
	Total	a + c	b + d	N

Donde:

N = Número de muestra aleatoria. (Cálculo de Sensibilidad y Especificidad para Test Diagnóstico)

a = Verdaderos Positivos = Número de individuos con la enfermedad y cuyo resultado de la prueba es positivo.

b = Falsos Positivos = Número de individuos sin la enfermedad y cuyo resultado de la prueba es positivo.

c = Falsos Negativos = Número de individuos con la enfermedad y cuyo resultado de la prueba es negativo.

d = Verdaderos Negativos = Número de individuos sin la enfermedad y cuyo resultado de la prueba es negativo.

6.1.3.2 Cálculo de Valores Predictivos del Test Diagnóstico.

El Valor Predictivo de un test mide la verdadera presencia o ausencia de la enfermedad. El valor predictivo está asociado íntimamente a la sensibilidad y especificidad de la prueba. Se tienen:

- Valor Predictivo de una prueba positiva (VPP).

En pruebas de diagnóstico, es la probabilidad de que una persona con un test positivo sea un real positivo (es decir, tenga la enfermedad). Es la proporción de los verdaderos positivos sobre todos los positivos:

$$\text{VPP} = \frac{a}{a + b} \times 100$$

- Valor Predictivo de una prueba negativa (VPN).

Es la probabilidad de que la persona con una prueba negativa no tenga la enfermedad. Es la proporción de los verdaderos negativos sobre todos los negativos:

$$\text{VPN} = \frac{d}{c + d} \times 100$$

7. RESULTADOS

7.1 Diagnóstico por el método de ELISA convencional para *T. cruzi*

Al utilizar el método de ELISA-EAE convencional para el análisis de los 90 sueros, 24.4% de éstos mostraron una densidad óptica mayor a 0.395 (límite superior de la Zona Gris), siendo éstos sueros positivos bien definidos. 57.8% mostraron una densidad óptica (D.O.) menor a 0.292 (límite inferior de la Zona Gris) demostrándolos como negativos bien definidos. Un 17.8% de los sueros dieron una D.O. que se ubica dentro de la Zona Gris (+/- 15% del Cut-Off), vale decir entre 0.292 y 0.395. Estos sueros no llegan a formar parte de los positivos ni negativos definidos, por tanto se les dio el nombre de “dudosos” o no concluyentes, por lo que la especificidad de este método no es muy elevada, puesto que el número y porcentaje de resultados dudosos es relativamente elevado. (**Gráfico 1**)

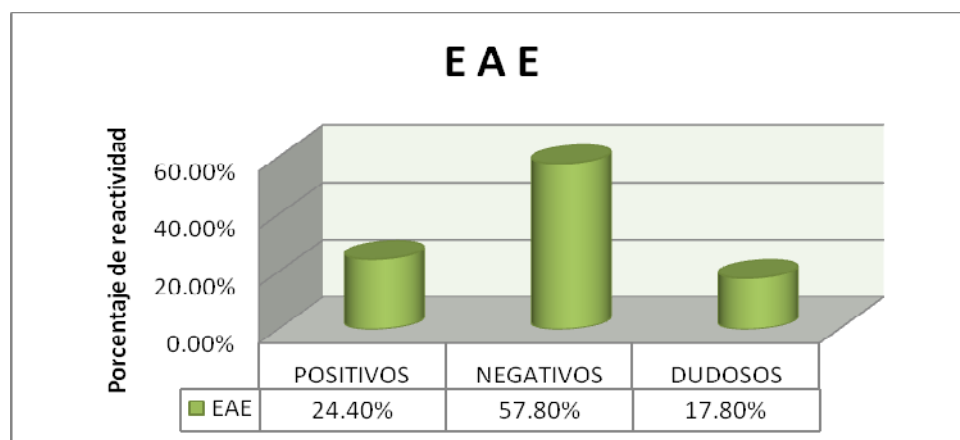


Gráfico 1. Resultados, en porcentaje, obtenidos por ELISA convencional (con EAE) (Tabla, Anexo 1)

7.2 Diagnóstico de la enfermedad de Chagas por la técnica de IFI convencional.

Al estudiar los 90 sueros de la muestra por el método de IFI (Inmunofluorescencia Indirecta), los sueros mostraron un 38.89% de positividad. La ausencia de resultados dudosos se debe simplemente al tipo de interpretación de la lectura de placas (positivo con fluorescencia en formas parasitarias de la impronta, negativo con la ausencia de fluorescencia en las mismas). Este método aparentemente presenta especificidad bien

definida puesto que el número y porcentaje de resultados dudosos es nulo y por ello, daría la certeza de un buen diagnóstico, sin embargo, los sueros definidos por este método, resultan mostrar más sueros definidos como positivos y pueden ser falsos positivos por la baja especificidad del mismo, puesto que el mismo puede cruzar con diagnóstico de otros protozoarios a nivel de antígenos de superficie. **(Gráfico 2)**

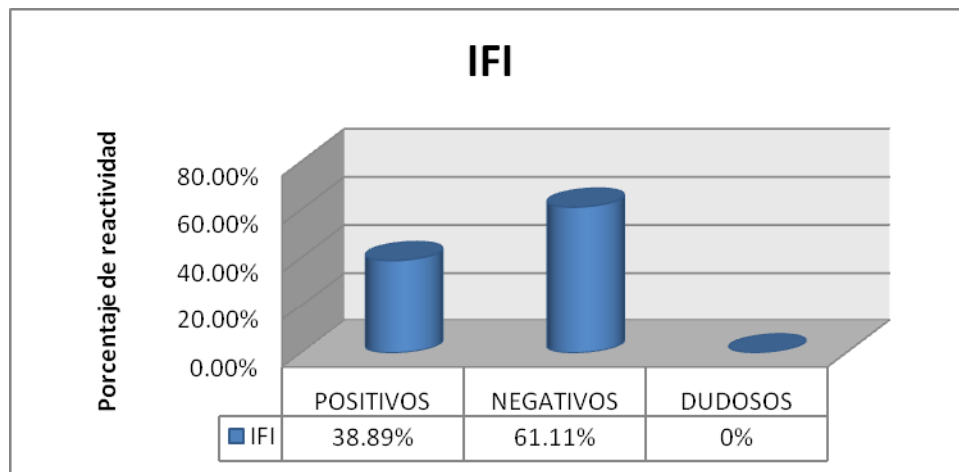


Gráfico 2. Resultados, en porcentaje, obtenidos por IFI. **(Tabla, Anexo 1)**

Relación porcentual entre las técnicas convencionales ELISA-EAE con IFI

La inmunofluorescencia indirecta (IFI) es una técnica cualitativa que no presenta casos dudosos (por las características propias de lectura). Sin embargo, por utilizar epimastigotes como antígeno de superficie, su especificidad no es la deseada y puede presentar reacción cruzada con *Leishmania*, por ejemplo, en sueros de aquellos pacientes que habitan zonas endémicas tanto para la enfermedad de Chagas como para Leishmaniasis. **(Gráf.3)**

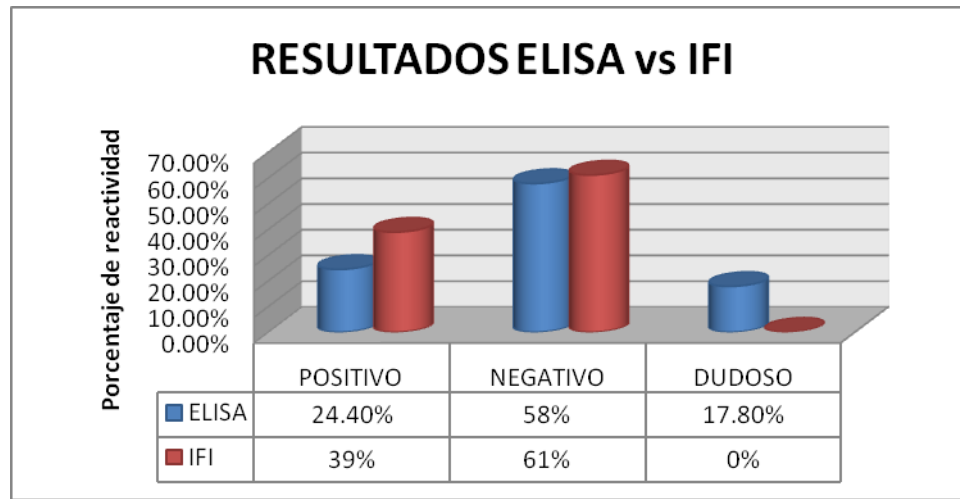


Gráfico 3. Relación entre resultados de las dos técnicas que constituyen el Gold Standard compuesto. (Tabla de frecuencias: Anexo 1)

Tabla de contingencia ELISA-EAE vs IFI

La siguiente tabla muestra la relación de seroreactividad (positividad y negatividad) obtenida por los dos métodos que constituyen el Gold Standard.

E L I S A - E A E	INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)		
	Positivos	Negativos	Total
Positivos	22	3	25
Negativos	13	52	65
Total	35	55	90

7.3 Diagnóstico por el método de ELISA-H 49 para *T. cruzi*

Al utilizar el método de ELISA con el antígeno recombinante H49 para el análisis de los 90 sueros, éstos mostraron una densidad óptica mayor a 0.401 (límite superior de la Zona Gris) un 30% de ellos, siendo éstos sueros positivos bien definidos. 63.3% mostraron una

densidad óptica (D.O.) menor a 0.296 (límite inferior de la Zona Gris) mostrando a estos sueros como Negativos bien definidos. Un 6.7.% de los sueros dieron una densidad óptica, .que se ubica dentro de la Zona Gris (+/- 15% del Cut-Off), vale decir entre 0.296 y 0.401. Estos sueros no llegan a formar parte de los positivos o negativos definidos, por tanto se les dio el nombre de “dudosos” o no concluyentes. Con los resultados obtenidos por esta técnica se puede observar que el número y porcentaje de resultados dudosos disminuye considerablemente con respecto a la técnica de ELISA-EAE y por ello, mejora la opción de un diagnóstico certero.

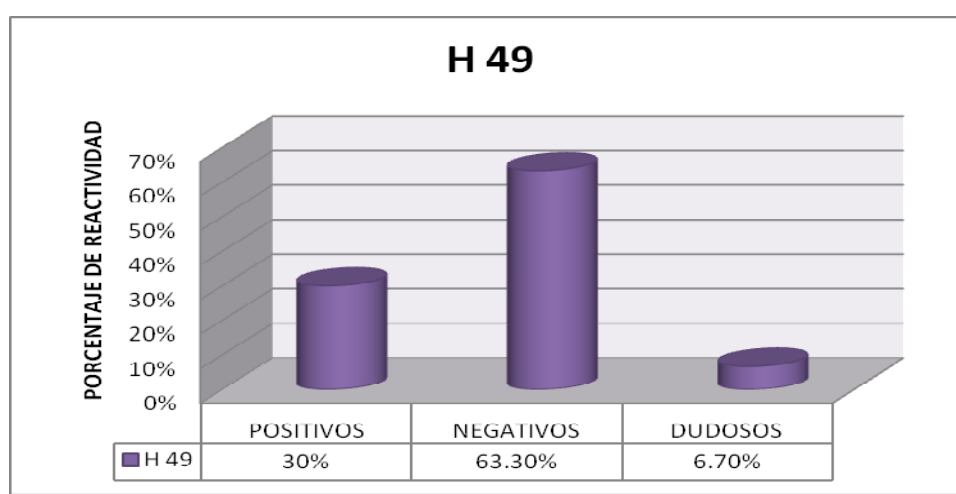


Gráfico 4. Resultados, en porcentaje, obtenidos por el método de ELISA con antígeno recombinante H49. (Tabla, Anexo 2)

Relación entre las técnicas convencionales ELISA (EAE) con IFI y ELISA-H49

Al observar los resultados, resalta que con el antígeno H 49 se obtuvieron resultados cercanos a lo que sería el promedio de ambas técnicas consideradas como Gold Standard. Con el método de ELISA-H49 se obtuvieron menos resultados “dudosos”(6.7%) con respecto al estándar de referencia (8.9%), lo cual indica que esos casos se confirmaron como positivos o negativos verdaderos. Se observa que el H 49 como antígeno de ELISA es confiable. (Gráf. 5)

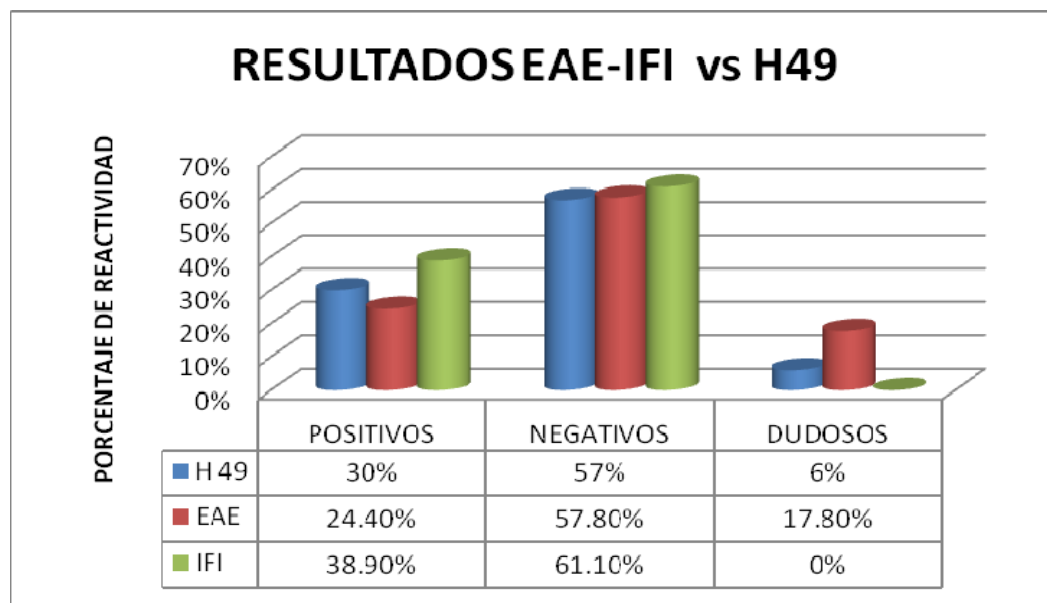


Gráfico 5. Relación porcentual de resultados obtenidos por los métodos convencionales de ELISA e IFI con ELISA-H 49 (**Tabla Anexo 2**)

7.4 Diagnóstico por método de ELISA con JL 8 para *T. cruzi*

Al utilizar el método de ELISA con el antígeno recombinante JL8 para el análisis de los 90 sueros, éstos mostraron una densidad óptica mayor a 0.404 (límite superior de la Zona Gris) un 28.9% de ellos, siendo éstos sueros positivos bien definidos. 60% mostraron una densidad óptica (D.O.) menor a 0.298 (límite inferior de la Zona Gris) mostrando a estos sueros como Negativos bien definidos. Un 11.1.% de los sueros dieron una D.O. que se ubica dentro de la Zona Gris (+/- 15% del Cut-Off), vale decir entre 0.298 y 0.404. Estos sueros no llegan a formar parte de los positivos o negativos definidos, por tanto se les dio el nombre de “dudosos” o no concluyentes. Los resultados demuestran que el número de resultados dudosos es mayor que lo obtenido con el anterior método de antígeno recombinante y por ello, lleva a la duda de catalogar a los verdaderos positivos y negativos. (Gráf. 6)

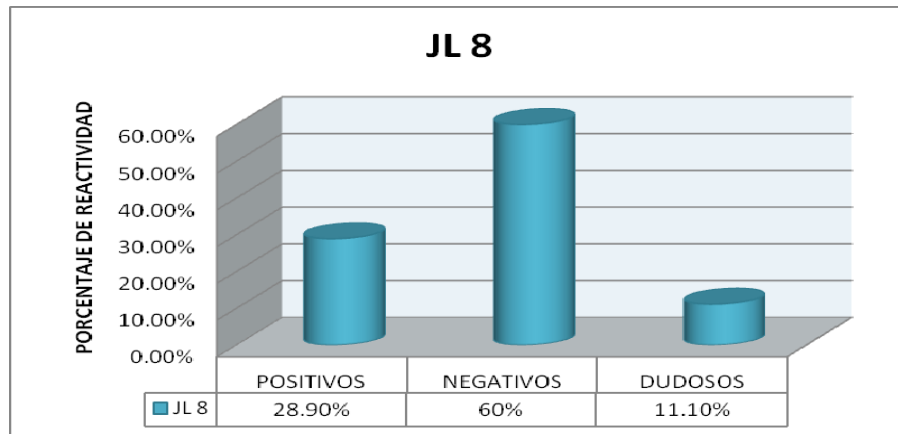


Gráfico 6. Resultados en porcentaje obtenidos por el método de ELISA con antígeno recombinante JL 8 (Tabla, Anexo 3)

Relación entre las técnicas convencionales ELISA (EAE) con IFI y ELISA-JL 8

Observando los resultados con el empleo de este antígeno, resalta que con el antígeno JL 8 se obtuvieron resultados diferentes a lo que sería el promedio de ambas técnicas consideradas como Gold Standard. Se obtuvieron más resultados “dudosos” que con ELISA-H49, pero menos que con ELISA-EAE, por lo cual se ve la interferencia de posibles reacciones cruzadas. (Gráf. 7)

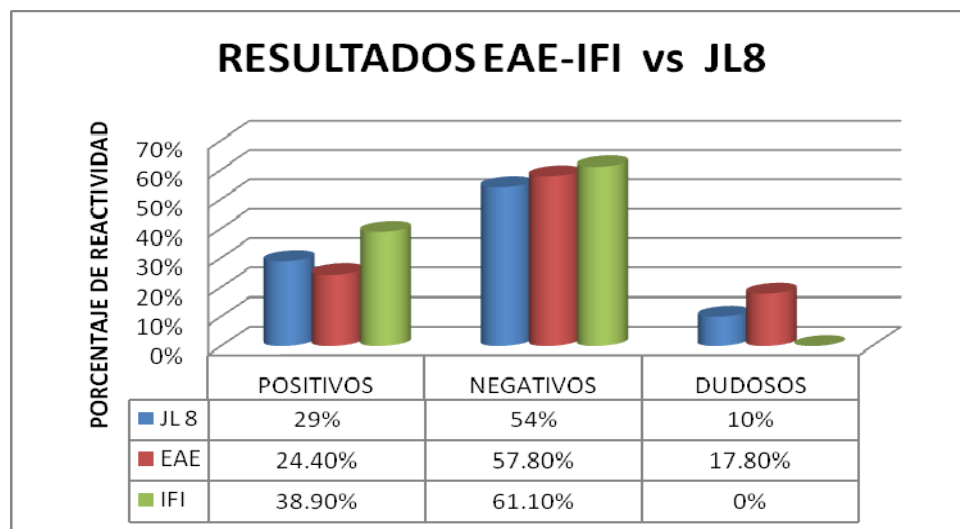


Gráfico 7.-Relación porcentual de resultados obtenidos por los métodos convencionales de ELISA e IFI versus ELISA-JL8 (Tabla Anexo 3)

7.5 Diagnóstico por método de ELISA con mezcla de antígenos recombinantes (H49+JL8+MAP) para *T. cruzi*

Al utilizar el método de ELISA con la mezcla o mix de tres antígenos recombinantes: H49+JL8+MAP, en el análisis de los 90 sueros, éstos mostraron una densidad óptica mayor a 0.399 (límite superior de la Zona Gris) un 21.1% de ellos, siendo éstos sueros positivos bien definidos. 72.2% mostraron una densidad óptica (D.O.) menor a 0.295 (límite inferior de la Zona Gris) mostrando a estos sueros como negativos bien definidos. Un 6.7% de los sueros dieron una D.O. que se ubica dentro de la Zona Gris (+/- 15% del Cut-Off), vale decir entre 0.295 y 0.399. Estos sueros no llegan a formar parte de los positivos o negativos definidos, por tanto se les dio el nombre de “dudosos” o no concluyentes.

Se observa que los resultados positivos disminuyen en número con respecto al ELISA-EAE convencional y a ELISA-H49, así cataloga a los sueros como positivos y negativos bien definidos, por lo cual, mejora el diagnóstico. (Gráf. 8)

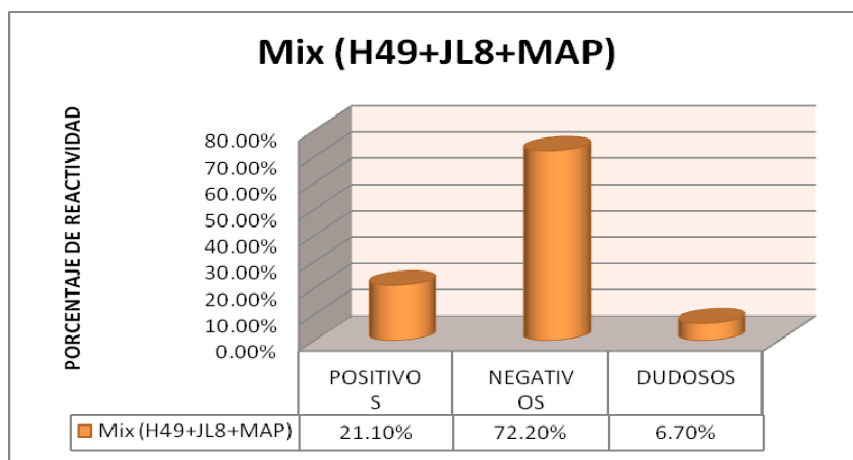


Gráfico 8. Resultados, en porcentaje, obtenidos por el método de ELISA con una mezcla de antígenos recombinantes (H 49 + JL 8 + MAP). (Tabla, Anexo 4)

Relación entre las técnicas convencionales ELISA (EAE) con IFI y ELISA-con mezcla de antígenos recombinantes (H49+JL8+MAP)

Al observar los resultados, resalta que con el la mezcla o Mix de Antígenos Recombinantes

(H 49+JL8+MAP) se obtuvieron mejores resultados que los obtenidos con las dos técnicas que forman el Gold Standard. Se obtuvieron menos resultados “dudosos” (6.7%) respecto al ELISA-EAE, lo cual indica que de los 16 casos dudosos encontrados con ese método, 10 se definieron como positivos o negativos verdaderos. (Gráf. 9)

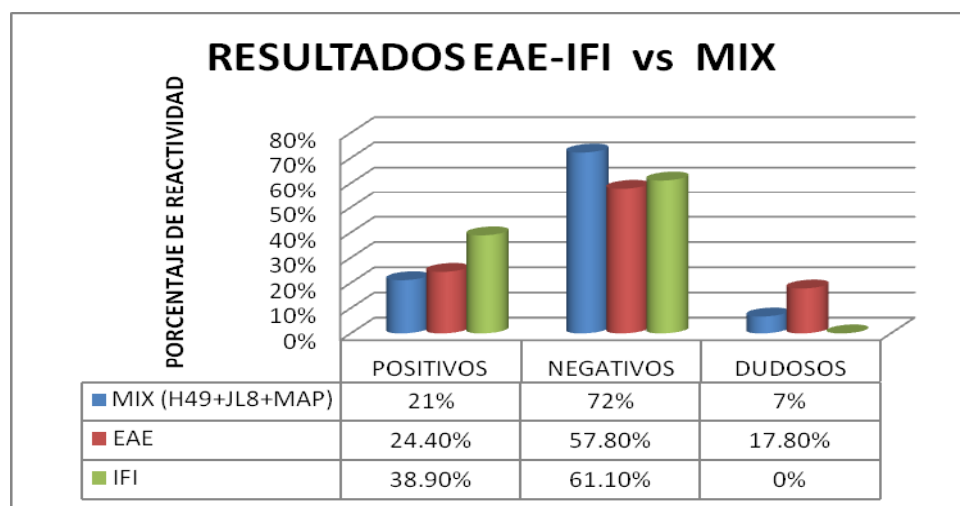


Gráfico 9.- Relación porcentual de resultados obtenidos por los métodos convencionales de ELISA e IFI con ELISA-(H49+JL8+MAP) (Tabla Anexo 4)

7.6 Diagnóstico por el método de ELISA con TESA para *T. cruzi*

Al utilizar el método de ELISA con el antígeno TESA (de Excreción y Secreción de Trypomastigotes), para el análisis de los 90 sueros, éstos mostraron una densidad óptica mayor a 0.403 (límite superior de la Zona Gris) un 21.1% de ellos, siendo éstos sueros positivos bien definidos. 78.9% mostraron una densidad óptica (D.O.) menor a 0.297 (límite inferior de la Zona Gris) mostrando a estos sueros como negativos bien definidos. Ninguno de los sueros mostraron lecturas que estén dentro de la Zona Gris (+/- 15% del Cut-Off), vale decir entre 0.297 y 0.403, por lo que ningún suero dio resultado dudoso o no concluyente.

La siguiente tabla demuestra que los resultados dudosos no existen, lo cual da lugar a mejorar la opción de un diagnóstico certero. Esto, porque el antígeno TESA es más específico debido a su obtención y a partir de la forma evolutiva de la cual se extrae. Este

hecho se comprueba posteriormente con los valores elevados de sensibilidad y especificidad.

Porcentaje de resultados según método de ELISA con TESA para *T. cruzi*

RESULTADO	ELISA-TESA	%
POSITIVOS	19	21.1
NEGATIVOS	71	78,9
TOTAL	90	100

Relación entre resultados obtenidos por los métodos de ELISA con antígeno TESA y ELISA-EAE e IFI

Al observar los resultados, resalta que con el antígeno TESA se obtuvieron resultados bien definidos, a diferencia de las dos técnicas que forman el Gold Standard: ELISA-EAE e IFI. Los resultados “dudosos” fueron definidos por esta técnica, como positivos o negativos.

(Gráfico 11)

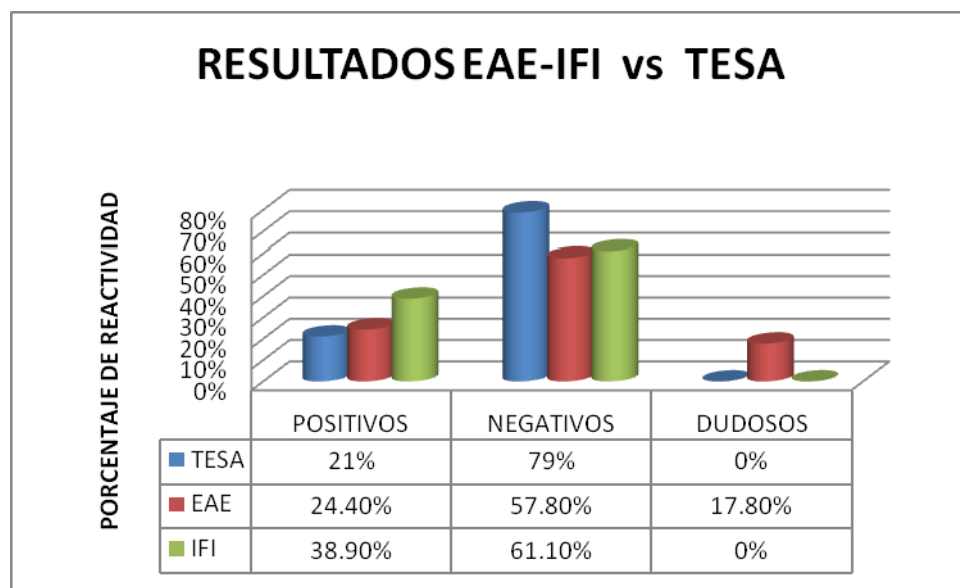


Gráfico 11.- Relación porcentual de resultados obtenidos por los métodos convencionales de ELISA e IFI con ELISA-TESA (Tabla Anexo 5)

7.7 Distribución porcentual de seroreactividad de los diferentes métodos

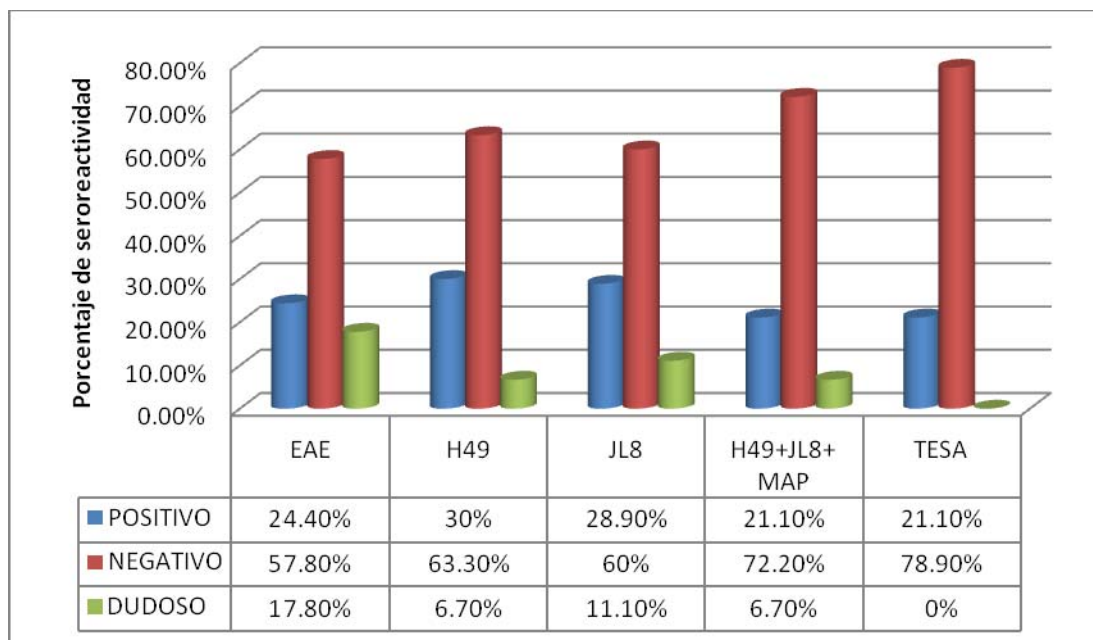


Gráfico 12.-

Según se puede observar en el gráfico 12, el método de ELISA con mezcla de antígenos recombinantes (H49+JL8+MAP) y el que usa el antígeno TESA, casi no presentan casos de pacientes dudosos y sí aumentan sus resultados negativos, mostrando así que detecta más los verdaderos negativos, que pasaban por dudosos en las otras técnicas. También se observa que disminuyen sus casos positivos pues, al ser más específicos, estarían descartando los falsos positivos. (**Anexo 6**)

7.8 Cálculo de Valores Predictivos para ELISA con EAE

Valor Predictivo Positivo (VPP):

$$\text{VPP} = \frac{28}{28 + 3} \times 100 = \frac{28}{31} \times 100 = 90.3\%$$

- El Valor Predictivo Positivo de este método es 90.3%, lo cual indica confiabilidad porque este valor es cercano al 100%, da una buena frecuencia de individuos infectados entre todas las personas con resultados positivos.

Valor Predictivo Negativo (VPN):

$$\text{VPN} = \frac{54}{5 + 54} \times 100 = \frac{54}{59} \times 100 = 91.52\%$$

- El Valor Predictivo Negativo de este método, del 91,52%, está indicando que hay bastante frecuencia de individuos no infectados entre todas las personas con resultados negativos.

7.9 Test Dx de IFI según el Criterio de Verdad dado por EAE

		CRITERIO DE VERDAD		
		Enfermos	No Enfermos	Total
IFI PARA CHAGAS	Positivos	22	8	30
	Negativos	9	51	60
	Total	31	59	90

$$\text{SENSIBILIDAD } S = \frac{22}{22 + 9} = \frac{22}{31} = 0.709 \times 100 = 70.9\%$$

$$\text{ESPECIFICIDAD } E = \frac{51}{8 + 51} = \frac{51}{59} = 0.864 \times 100 = 86.4\%$$

$$\text{EFICIENCIA} = \frac{22 + 51}{22 + 8 + 51 + 9} = \frac{73}{90} = 0.811 \times 100 = 81.1\%$$

El Índice de sensibilidad de la técnica IFI (Inmunofluorescencia Indirecta) para Chagas resultó en 70.9%, valor bajo pero que se esperaba para esa técnica en especial. Como en otros trabajos, esta técnica da mayor especificidad, confirmándose con un valor de 86.4%. Muestra así una eficiencia de 81.1%, que es bastante baja.

7.10 Cálculo de Valores Predictivos para IFI

Valor Predictivo Positivo (VPP):

- El Valor Predictivo Positivo de este método dio 73.3%, lo cual indica poca certeza en detectar la frecuencia de individuos infectados entre todas las personas con resultados positivos. (Anexo 7)

Valor Predictivo Negativo (VPN):

- El Valor Predictivo Negativo de este método está indicando que existe poca frecuencia de individuos no infectados entre todas las personas con resultados negativos. Es relativamente bajo: del 85%.(Anexo 7)

7.11 Test Dx de ELISA con H 49 según el Criterio de Verdad dado por EAE/IFI

		CRITERIO DE VERDAD		
		Enfermos	No Enfermos	Total
ELISA PARA CHAGAS CON H 49	Positivos	27	1	28
	Negativos	5	57	62
	Total	32	58	90

SENSIBILIDAD	$S = \frac{27}{27 + 1} = \frac{27}{28} = 0.964 \times 100 = 96.4\%$
---------------------	---

$$\text{ESPECIFICIDAD } E = \frac{57}{1 + 57} = \frac{57}{58} = 0.983 \times 100 = 98.3\%$$

$$\text{EFICIENCIA} = \frac{27 + 57}{27 + 1 + 57 + 5} = \frac{84}{90} = 0.93 \times 100 = 93\%$$

El Índice de Sensibilidad del método ELISA con el antígeno recombinante H 49 fue de 96,4% , lo cual indica buena sensibilidad. La Especificidad obtenida fue del 98.3 % que es también un muy buen índice, demostrando que el método cumple lo exigido para ser un parámetro de diagnóstico. La eficiencia del método es bastante aceptable pues mostró un 93.3%.

7.12 Cálculo de Valores Predictivos para ELISA con H49

Valor Predictivo Positivo (VPP):

- El Valor Predictivo Positivo de este método dió 96%, lo cual indica confiabilidad, ya que da una buena frecuencia de individuos infectados entre todas las personas con resultados positivos, cercana al 100%.(Anexo 8)

Valor Predictivo Negativo (VPN):

- El Valor Predictivo Negativo de este método está indicando que hay bastante frecuencia de individuos no infectados entre todas las personas con resultados negativos. Es del 92%.(Anexo 8)

7.13 Test Dx de ELISA con J L 8 según el Criterio de Verdad dado por EAE/IFI

		CRITERIO DE VERDAD		
		Enfermos	No Enfermos	Total
ELISA PARA CHAGAS CON H 49	Positivos	26	3	29
	Negativos	7	54	61
	Total	33	57	90

SENSIBILIDAD	$S = \frac{26}{26 + 3} = \frac{26}{29} = 0.896 \times 100 = 89.6\%$
ESPECIFICIDAD	$E = \frac{54}{3 + 54} = \frac{54}{57} = 0.947 \times 100 = 94.7\%$

EFICIENCIA	$= \frac{26 + 54}{26 + 3 + 7 + 54} = \frac{80}{90} = 0.89 \times 100 = 89\%$
-------------------	--

El Índice de Sensibilidad del método ELISA con el antígeno recombinante JL 8 fue de 89.6% , lo cual indica que no es muy sensible. La Especificidad obtenida fue del 94.7 % constituyendo un buen índice, pero, como no tiene buena sensibilidad, el método usado en forma independiente, no cumple lo exigido para ser un parámetro de diagnóstico confiable. Su eficiencia es baja pues resultó en un 89%.

7.14 Cálculo de Valores Predictivos para ELISA con JL 8

Valor Predictivo Positivo (VPP):

- El Valor Predictivo Positivo de este método es 89%, lo cual indica confiabilidad disminuida ya que no tiene buena frecuencia de individuos infectados entre todas las personas con resultados positivos, es menor del 90%. (**Anexo 9**)

Valor Predictivo Negativo (VPN):

- El Valor Predictivo Negativo de este método está indicando que no hay bastante frecuencia de individuos no infectados entre todas las personas con resultados negativos. Es sólo del 88%, menos del 90%.(Anexo 9)

7.15 Test Dx de ELISA con mezcla de Antígenos Recombinantes (H49+JL8+MAP) con relación al EAE/IFI

		CRITERIO DE VERDAD		
		Enfermos	No Enfermos	Total
ELISA PARA CHAGAS CON Mix AgRb (H49+JL8+MAP)	Positivos	19	1	20
	Negativos	5	65	70
	Total	24	66	90

SENSIBILIDAD	$S = \frac{19}{19 + 1} = \frac{19}{20} = 0.95 \times 100 = 95\%$
ESPECIFICIDAD	$E = \frac{65}{1 + 65} = \frac{65}{66} = 0.985 \times 100 = 98.5\%$

EFICIENCIA	$= \frac{19 + 65}{19 + 1 + 5 + 65} = \frac{84}{90} = 0.93 \times 100 = 93\%$
-------------------	--

El Índice de Sensibilidad del método ELISA con el Mix de Antígenos Recombinantes (H 49 + JL 8 + MAP), fue de 95% , lo cual indica buena sensibilidad. La Especificidad obtenida fue del 98.5 % indicando que el método ofrece bastante especificidad en relación al parásito que produce la enfermedad a detectar, demostrando que el método cumple lo

exigido para ser un parámetro de diagnóstico confiable. Su eficiencia también, por lo tanto es buena: del 93%.

7.16 Cálculo de Valores Predictivos para ELISA con mezcla de Ag Rb (H49+JL8+MAP)

Valor Predictivo Positivo (VPP):

- El Valor Predictivo Positivo de este método es 95%, lo cual indica confiabilidad ya que se da una buena frecuencia de individuos infectados entre todas las personas con resultados positivos, cercana al 100%. **(Anexo 10)**

Valor Predictivo Negativo (VPN):

- El Valor Predictivo Negativo de este método está indicando que hay bastante frecuencia de individuos no infectados entre todas las personas con resultados negativos. Es del 93%. **(Anexo 10)**

7.17 Test Dx de ELISA con TESA según el Criterio de Verdad dado por EAE/IFI

		CRITERIO DE VERDAD		
		Enfermos	No Enfermos	Total
ELISA PARA CHAGAS CON TESA	Positivos	18	1	19
	Negativos	1	70	71
	Total	19	71	90

SENSIBILIDAD	$S = \frac{18}{18 + 1} = \frac{18}{19} = 0.95 \times 100 = 95\%$
---------------------	--

$$\text{ESPECIFICIDAD} \quad E = \frac{70}{1 + 70} = \frac{70}{71} = 0.986 \times 100 = 98.6\%$$

$$\text{EFICIENCIA} = \frac{18 + 70}{18 + 1 + 70 + 1} = \frac{88}{90} = 0.977 \times 100 = 97.7\%$$

El Índice de Sensibilidad del método ELISA con el antígeno TESA fue de 95% , lo cual indica buena sensibilidad. La Especificidad obtenida fue del 98.6 % que es también un muy buen índice, demostrando que el método cumple lo exigido para ser un parámetro de diagnóstico. La eficiencia del método es buena ya que representa un 97.7%.

7.18 Cálculo de Valores Predictivos para ELISA con TESA-

Valor Predictivo Positivo (VPP):

- El Valor Predictivo Positivo de este método es 94.7%, lo cual indica confiabilidad, ya que da una buena frecuencia de individuos infectados entre todas las personas con resultados positivos, cercana al 100%.**(Anexo 11)**

Valor Predictivo Negativo (VPN):

- El Valor Predictivo Negativo de este método está indicando que hay bastante frecuencia de individuos no infectados entre todas las personas con resultados negativos. Es del 98.6%.**(Anexo 11)**

7.19 Análisis comparativo entre Valores Predictivos de los diferentes métodos

Indicador- Valores Predictivos	ELISA- EAE	IFI	ELISA- H49	ELISA JL8	ELISA-MIX (H49+JL8+MAP)	ELISA- TESA
VPP	90.3%	73.3%	96%	89%	95%	94.7%
VPN	91.52%	85%	92%	88%	93%	98.6%

Comparación entre índices de validez de Prueba Diagnóstica según método.

Si se realiza una comparación entre éstos valores de referencia contra los encontrados en el presente trabajo, se tiene el siguiente gráfico:

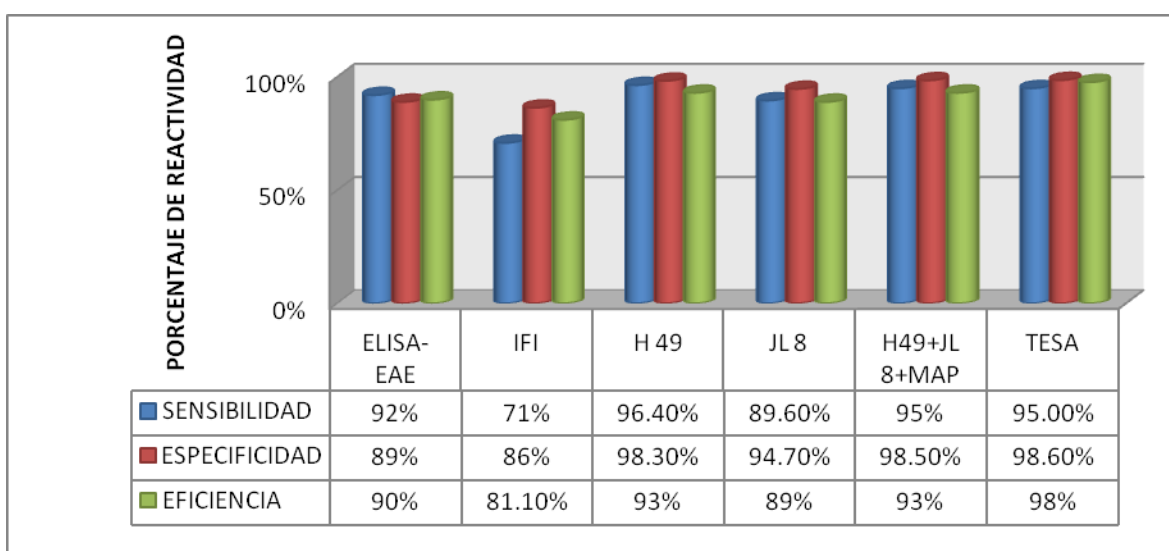


Gráfico 13.-Este gráfico muestra que los métodos probados contra el Gold Standard compuesto (ELISA-EAE + IFI) dan similares (JL8) o mejores índices de sensibilidad, especificidad y eficiencia (caso de H 49, Mix de H49+JL8+MAP y TESA). (Tabla en Anexo 12)

7.20 Distribución de pacientes según género

En el análisis del género en el grupo de pacientes estudiados, se observó que la mayor cantidad son del sexo masculino, correspondiendo a un 58.9 %.

SEXO	FEMENINO	MASCULINO	TOTAL
N° PACIENTES	37	53	90
PORCENTAJE	41.1%	58.9%	100%

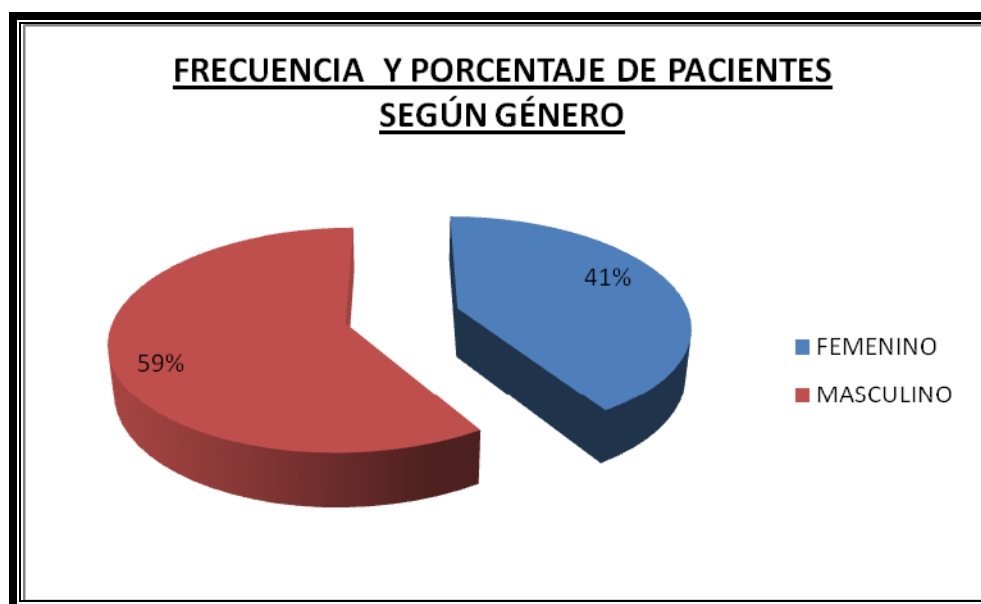


Gráfico 14.- Distribución de pacientes estudiados de acuerdo a género. Muestra claramente el mayor porcentaje de participación en el estudio, del sexo masculino (58.9% \approx 59%)

7.21 Distribución de resultados por seropositividad (con mezcla de antígenos recombinantes) según género

En el análisis de resultados de seropositividad según género en el grupo de pacientes estudiados, se observó que el mayor porcentaje de positivos, entre varones y mujeres, corresponden al sexo masculino, correspondiendo al 14.4 %, por otra parte, también en el grupo de negativos, el mayor porcentaje corresponde al género masculino, con un 32.2%. Estos resultados están en relación al mayor porcentaje de varones participantes del estudio.

SEXO	FEMENINO	MASCULINO
------	----------	-----------

RESULTADO	N°	%	N°	%
POSITIVO	6	6.8	13	14.4
NEGATIVO	29	40	36	32.2
DUDOSO	2	2.2	4	4.4

7.22 Distribución de pacientes según rangos de edad.

Al observar el siguiente cuadro, resalta que la mayor cantidad de pacientes de este estudio están en las edades de mayor productividad de la vida (entre 40 y 60 años) que, a la vez es la más aquejada por la enfermedad en su etapa crónica, ya que ésta tiene la característica de pasar desapercibida hasta después de un promedio de 35 años después de adquirir la infección.

EDAD	18 - 29	30 - 41	42 - 53	54 - 65	TOTAL
FRECUENCIA	5	17	31	37	90
PORCENTAJE	5.6%	18,9%	34.4%	41.1%	100%

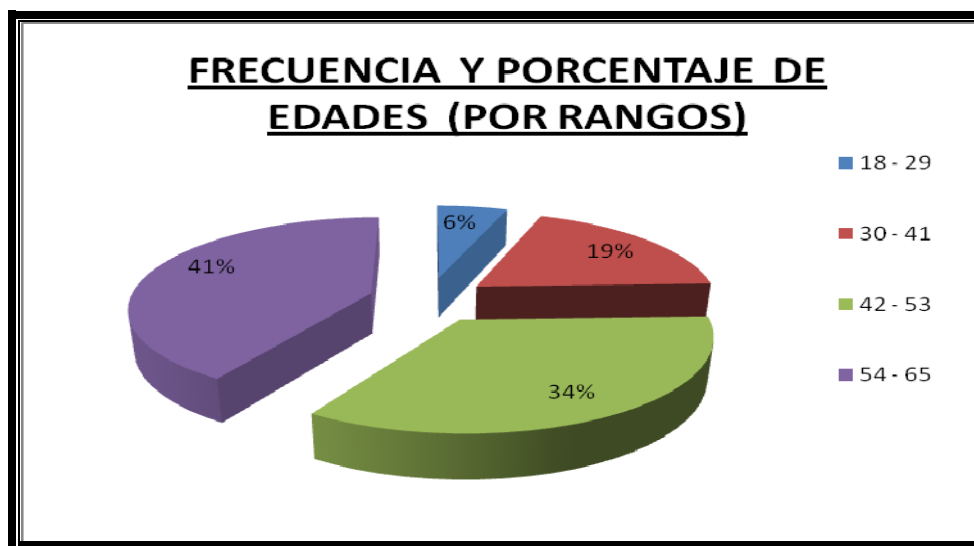


Gráfico 15.- Distribución de frecuencia y porcentajes del número de pacientes estudiados, de acuerdo a rangos de edades.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de datos se utilizaron las Frecuencias Porcentuales y fórmulas estadísticas predeterminadas para el diseño planteado (Test Diagnóstico) en el cálculo de Índices de Sensibilidad, Especificidad y Eficacia.

Al determinar eficiencia de las diferentes técnicas evaluadas para demostrar que el Mix de Antígenos Recombinantes es una de las mejores, se utilizó el Programa Estadístico SYSTAT 11, con la Prueba de los Signos de Wilcoxon, que es una prueba no paramétrica, que compara la media de dos muestras relacionadas para determinar si existen diferencias entre ellas. Esta prueba sugiere que la media es igual a la mediana y el procedimiento puede emplearse en probar que la hipótesis nula $H_0=H_1$.

En el presente trabajo se plantea:

H_0 : No hay diferencia significativa entre la prueba planteada y la de ELISA(EAE)/IFI

H_1 : Si hay diferencia significativa entre la prueba planteada y la de ELISA(EAE)/IFI

En la variable X el Factor de diseño fue: Técnicas de diagnóstico (discreto)

Niveles del factor:

1. EAE/IFI
2. H49
3. JL8
4. Mix Ag Rb
5. TESA

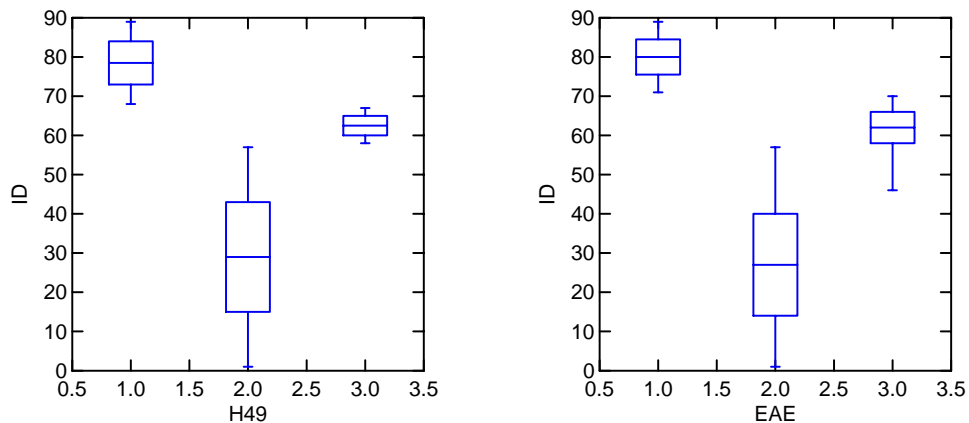
En la variable Y se colocó la variable de respuesta: Absorbancias.

Tamaño de muestra: 90

Nivel de significancia aceptado: $p=0,05$

De este modo consideramos si $p > 0,05$, entonces aceptamos la Hipótesis nula H_0 para cada nivel de factor considerado como par, con relación al EAE/IFI. Por el contrario, si $p < 0,005$, rechazamos la Hipótesis Nula H_0 y aceptamos la H_1 o Alterna (nuestra)

1) Para la prueba de ELISA con H 49, con relación a ELISA(EAE)/IFI



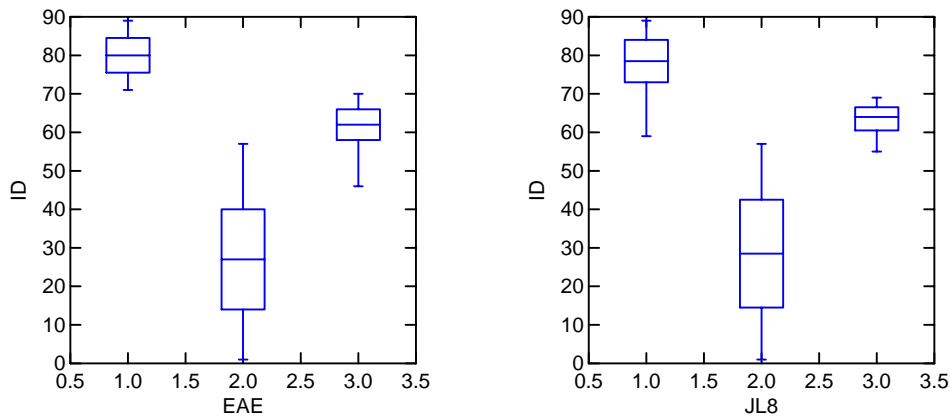
H0: No hay diferencia significativa entre la prueba H49 y la EAE/IFI

H1: Si hay diferencia significativa entre la prueba H49 y la EAE/IFI

Se obtuvo: $p=0.016$ Entonces, se rechaza la Ho. (Tabla Anexo 21)

Se tienen dos lados de probabilidades para cada par de variables

2) Para la prueba de ELISA con JL 8 con relación a ELISA(EAE)/IFI

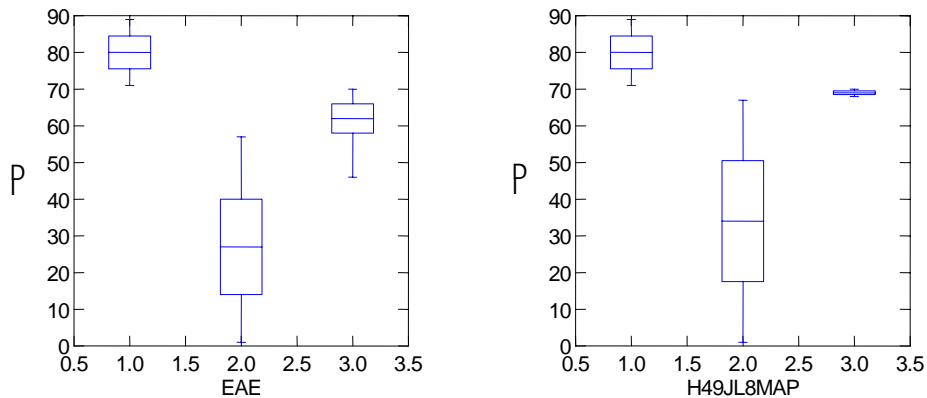


H0: No hay diferencia significativa entre la prueba JL 8 y la EAE/IFI

H1: Si hay diferencia significativa entre la prueba JL 8 y la EAE/IFI

Se obtuvo: $p=0.031$ Se rechaza la Ho. (Tabla Anexo 21)

3) Para la prueba de ELISA con Mix de Ag Rb (H 49+ JL 8+ MAP) con relación a ELISA(EAE)/IFI

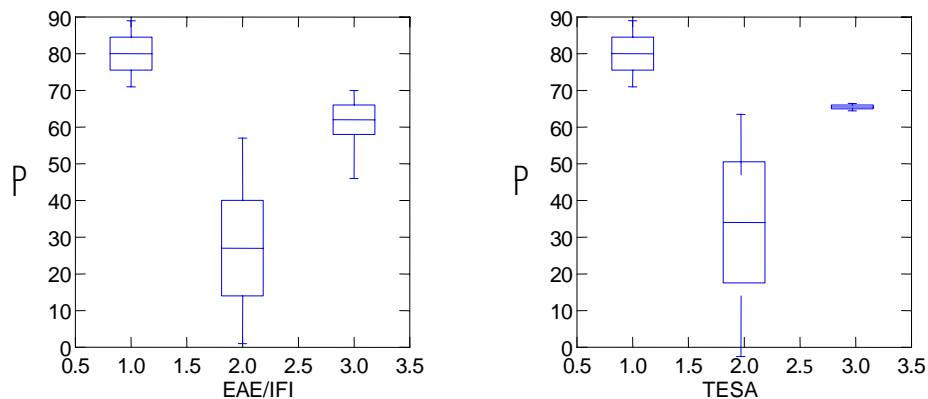


H0: No hay diferencia significativa entre la prueba Mix Ag Rb y la EAE/IFI

H1: Si hay diferencia significativa entre la prueba Mix Ag Rb y la EAE/IFI

Se obtuvo $p=0.001$ Se rechaza la Ho (**Tabla Anexo 21**)

4) Para la prueba de ELISA con antígeno TESA con relación a ELISA(EAE)/IFI



H0: No hay diferencia significativa entre la prueba ELISA-TESA y ELISA (EAE)/IFI

H1: Si hay diferencia significativa entre la prueba ELISA-TESA y ELISA (EAE)/IFI

Se obtuvo: $p=0.000$ Se rechaza la Ho (**Tabla Anexo 21**)

9. DISCUSIÓN

El presente estudio se realizó en base a un tamaño muestral aleatorio de 90 pacientes, mismo que se acerca al Tamaño Muestral obtenido por cálculo con la fórmula específica para una población finita (25, 30)

- A las 90 muestras de suero se realizaron las cuatro diferentes técnicas planteadas según los objetivos. Los resultados iniciales con la técnica base de referencia o Gold Standard, mostraron, un 24.4% de positivos, 57.8% de negativos y 17.8% de dudosos. Esto confirma lo planteado en trabajos anteriores con relación a las fallas del método convencional usado como referencia en la rutina diaria: ELISA con EAE (ELISA que usa la forma epimastigote de *T. cruzi*) (15: Umezawa et. Al, 2004) Se indica que los test convencionales de serología para Chagas (entre los que están IFI, HAI y además ELISA-EAE), dan un buen número de resultados inconclusivos (dudosos) y aún de falsos positivos (14: Da Silveira Et. Al 2001) (30,31,32), motivo por el cual estos métodos no son convenientes al ser utilizados solos y deben acompañarse de otros métodos más certeros. Se debe hacer notar que todas estas técnicas utilizan antígenos de la forma epimastigote del parásito, no estando presente esta forma en el huésped, sino solamente en el vector. Su uso se debe a la fácil producción en forma masiva en cultivos de epimastigotes in-vitro. Si bien el método de IFI es una buena posibilidad de diagnóstico, no presenta buena especificidad debido a que los antígenos de superficie de los epimastigotes de *T. cruzi* pueden fácilmente reaccionar con anticuerpos de otros protozoos como la *Leishmania* y sobretodo, dar resultados falso positivos en pacientes que habitan zonas de infección mixta, como es el caso de los pacientes estudiados en este trabajo. Además, presenta la gran desventaja del riesgo en el manejo de parásitos al preparar la impronta. Por este motivo, se trabajará con un Gold Standard compuesto (ELISA_EAE + Inmunofluorescencia Indirecta o IFI) Este es un argumento suficiente para buscar otros métodos de diagnóstico que mejore la especificidad junto a la sensibilidad. Además, con el fin de dar un diagnóstico certero al paciente, se debe mínimamente, corroborar el diagnóstico con al menos dos técnicas (1, 4)

- En las investigaciones mencionadas, se indica que la sensibilidad del ELISA-EAE es de 95.8%, mientras que la especificidad para fase aguda es de 94.7% siendo más baja para las otras dos fases de la enfermedad. (30,31,32). Además se tiene que la técnica de IFI da una sensibilidad baja, en tanto que sí presenta muy buena especificidad: 70,9% contra 91% (Laura, 2001).

Ambos métodos se refuerzan para mostrar, como Gold Standard compuesto, los diferentes índices de validez de las nuevas pruebas realizadas: Sensibilidad, Especificidad y Eficiencia.

- Con relación al uso de un antígeno recombinante individual en la técnica de ELISA, las investigaciones muestran que éstos no tienen la sensibilidad requerida unida a una buena especificidad, algunos presentan buena sensibilidad y deficiente especificidad o a la inversa (12, 14, 15, 30, 32).

Así por ejemplo, el antígeno H49 purificado mostró en un estudio desarrollado por otros investigadores, un alto grado de sensibilidad (87%) y una especificidad del 100% cuando fue ensayado por ELISA (30). Esto concuerda con los resultados obtenidos en el presente trabajo, donde el único antígeno recombinante H49 utilizado en forma individual, dió buenos resultados, con una sensibilidad obtenida de 96.4% y especificidad de 98.3%, mostrando, de los 90 pacientes, un 30% de positivos, 63.3% de negativos y solamente 6.7% de dudosos, lo cual le da mayor confiabilidad.

- Por otro lado, al ensayar el antígeno JL 8 solo, los resultados del presente trabajo muestran menor sensibilidad y especificidad que el anterior antígeno (89.6% y 94.7%) respectivamente, algo diferente a lo observado en estudios iniciales, esto probablemente por la especificidad de reacción más con la IgG, de modo que detecta mejor a los pacientes de fase crónica.(17. 30). Al mostrar el porcentaje de positivos de 28.9, de negativos: 60% y de dudosos del 11.1%, nos indica que detecta menos certeramente a los verdaderos negativos y da más resultados dudosos. La presencia de resultados dudosos se debe generalmente a la especificidad deficiente del método y por ello a su débil capacidad discriminatoria de epítopes similares presentes en el suero al momento de la reacción, dando lugar a

reacciones cruzadas leves y por tanto cierta reactividad que se coloca en la Zona Gris. También puede ser que la reactividad sea débil debido a tratamientos realizados o según la fase en la que se encuentra la enfermedad.

- Al ensayar individualmente el antígeno MAP, vieron que éste era reconocido por los anticuerpos IgG, pero más por los anticuerpos de la fase aguda de la enfermedad de Chagas, sin embargo, los resultados no siempre son concluyentes ya que presenta reacciones cruzadas (especialmente con *Plasmodium malarie*). (15, 16). Su sensibilidad aproximada es del 80.8% y su especificidad menor del 70% (17, 30) Este antígeno no se ensayó por estas limitantes y por la poca oportunidad de obtenerlo en forma individual En pruebas realizadas por investigadores se destacó su eficiencia unido a otros antígenos recombinantes.(21, 22).

- Según lo esperado al plantear el presente trabajo, la mezcla (mix) de tres antígenos recombinantes: H 49 + JL 8 + MAP, dió buena sensibilidad y mejor especificidad que los mismos antígenos al ser probados en forma individual: 95% de sensibilidad y 98.5% de especificidad, mostrando 21.1% de positivos, 72.2% de negativos y sólo 6.7% de dudosos. Así, disminuyen los probables resultados falsos. En trabajos pioneros del uso de Mix de Antígenos Recombinantes (12), se alcanzó 99.7% de sensibilidad y 98.6 % de especificidad. Datos a los cuales se acercan mucho los obtenidos en el presente estudio, que fueron de 95% de sensibilidad y 98.5% de especificidad.

- Por otro lado, con el uso del antígeno TESA en ELISA, se obtuvo resultados similares a los observados en ensayos de otros investigadores (21) En este trabajo se obtuvo una sensibilidad de 96.4%, con una también alta especificidad, del 98.3%. Los resultados mostraron que este método elimina la posibilidad de detección de falsos positivos o negativos. En los 90 pacientes mostró 21.1% de positivos y 78.9% de negativos. Con este método, la proporción de resultados dudosos fue nula, llegando a diagnosticar mejor las posibles reacciones cruzadas que dan resultados positivos bajos (que en realidad no lo son) o resultados no concluyentes. Sin embargo, presenta un inconveniente en el diagnóstico de rutina, su obtención es algo compleja y debe ser realizada por personal experimentado. Además, los antígenos de excreción y secreción son antígenos de la forma trypomastigotes,

formas parasitarias que están en el huésped, a partir de las cuales se induce la síntesis de anticuerpos anti-*T.cruzi*.

- Los resultados de sensibilidad y especificidad se obtuvieron en base al uso de la Tabla 2 X 2, internacionalmente aceptada para Medidas de Concordancia en Pruebas Diagnósticas. Por medio de ellas se realizaron los cálculos de los diferentes índices de las medidas de asociación entre los diferentes métodos estudiados en el presente trabajo.

10. CONCLUSIONES

- Al evaluar algunas herramientas moleculares e inmunológicas diferentes a las utilizadas convencionalmente, por ejemplo la mezcla de antígenos recombinantes y el antígeno TESA, como base antigénica en la técnica de ELISA, se obtuvieron resultados bien definidos en el fortalecimiento del diagnóstico serológico de la Enfermedad de Chagas. Así, con la mezcla de los antígenos recombinantes H49, JL8 y MAP, los resultados muestran muy buena sensibilidad, además de una excelente especificidad, lo cual es muy difícil lograr en un mismo antígeno. La Sensibilidad es del 95% con una Especificidad del 98.5%.
- Se lograron buenos resultados en el empleo de la técnica convencional ELISA con EAE (Extracto Alcalino de Epimastigotes) como Estándar de Oro para el tipo de diseño escogido. Sin embargo, el uso de la otra técnica convencional como la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), reforzó el Gold Estándar en la obtención de mayor especificidad y sensibilidad.
- Mediante la técnica de ELISA que emplea el antígeno recombinante H 49, la proporción de resultados dudosos fue del 6.7% contra el 17.8% de la técnica de referencia. Por ello se concluye que este antígeno puede diagnosticar mejor las posibles reacciones cruzadas que dan resultados positivos bajos o resultados inconclusivos (dudosos).
- Al valorar la reactividad del antígeno JL8 en forma individual, se probó que no presenta buena sensibilidad (89.6%), aunque si tiene buena especificidad (94.7%).
- Se obtuvo buena respuesta en la valoración de la reactividad del Mix o mezcla de los Antígenos Recombinantes seleccionados (H 49+ JL8 + MAP) ya que se comprobó una muy buena sensibilidad y especificidad (95% y 98.5% respectivamente).

- Se comprobó que el método que emplea Mix de Antígenos Recombinantes, es de gran utilidad al obtener un 93% de eficiencia, por ello, la valoración de esta mezcla específica (H49+JL8+MAP) fue positiva.
- Al valorar la reactividad del antígeno TESA, se comprobó que el método ELISA, empleando este antígeno (obtenido de las formas trypomastigotas en cultivo), es de gran utilidad al mostrar un 93% de eficiencia, además de presentar muy buena sensibilidad y especificidad unidas (96.4% y 98.3% respectivamente). Esto es de gran importancia en el fortalecimiento del diagnóstico de la enfermedad de Chagas, especialmente en la detección de casos crónicos, evitando reacciones cruzadas que impiden un tratamiento efectivo.
- El análisis global de todos los resultados nos permite hacer prevalecer el empleo de antígenos provenientes de las formas trypomastigotes del parásito causante de la enfermedad en estudio: Chagas, puesto que son las formas circulantes que están en el huésped y por ello, la respuesta inmune a *Trypanosoma cruzi* es la inducida específicamente por estas formas.
- Se concluye que, mediante la técnica de ELISA que emplea el antígeno TESA, la proporción de resultados dudosos fue nula, llegando a diagnosticar mejor las posibles reacciones cruzadas que dan resultados positivos bajos (que en realidad no lo son) o resultados no concluyentes. Por ello, este método es el óptimo para diagnósticos en casos de Chagas congénito y diagnóstico de descarte en Bancos de Sangre, especialmente.

11. RECOMENDACIONES

En el presente trabajo se obtuvieron resultados promisorios respecto al uso de antígenos diferentes a los comúnmente empleados en los métodos serológicos, como el ELISA, que es el método más utilizado en la rutina de laboratorios de diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Por este motivo se recomienda que se implementen en este tipo de laboratorios, técnicas con estos antígenos, como los antígenos recombinantes, tanto en su uso en forma individual como en la mezcla de ellos.

En cuanto al antígeno obtenido de la forma trypomastigota, TESA, se recomienda incursionar en el estudio y aplicación de los métodos de extracción de este antígeno, para incentivar la práctica de aplicación de los resultados de diversas investigaciones en nuestro medio, especialmente en el ámbito universitario.

Se recomienda realizar más evaluaciones de todos los antígenos que se están ya ofreciendo en el mercado internacional, aplicando éstos a diversos métodos, como el tradicional ELISA o ahora, algo más específico a cada fase de la enfermedad de Chagas, por ejemplo el inmunoblott. Se deberán continuar los estudios en esta área del diagnóstico para coadyuvar a las estrategias de ataque a una enfermedad que llega a ser de daño social.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO, Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). Partnerships and Capacity Building for Research and Product Development-WHO, TDR,2004.Página web:
www.who.int/tdr/research/progress9900/partnerships/chagas.htm
2. WHO World Health Organization. “Chagas, the disease” [2002 jun].Pg web:www.who.int/ctd/chagas/disease.htm
3. “Control de la Enfermedad de Chagas” Iniciativa del Cono Sur.(3/2/2000) Pg web: hct@paho.org.
4. WHO-World Health Organization, Burdens and trends in Chagas disease. WHO 2002 Pg web: www.who.int/ctd/chagas/burdens.htm
5. TDR Strategic Direction: Chagas disease 2002 Strategic Direction for Research: Chagas Disease - UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). Rivero Susana. Pg web: www.who.int/tdr
6. MOREL, C.M., Lazdins, J. 2003 Chagas Disease. *Nat Rev.Microbiol* 1: 14-15.
7. VILLA-VILLANUEVA L., J. María Escribáa, F. Parreño Rodríguez “Resultados del tratamiento de la enfermedad de Chagas en menores de 15 años en el Proyecto de Médicos Sin Fronteras en Tarija (Bolivia)” -*Revista Pediatría de Atención Primaria*. Vol.VII 2005;7 Supl 1:S 61-76
8. SEMG Solidaria. 2006. “Lucha por la erradicación de la Enfermedad de Chagas en Bolivia “- Pág. 554.555.
9. N.MEDRANO-MERCADO, R. Ugarte Fernandez, V. Butron S. Uberbusek, H.L. Guerra, Tania C. de Araujo, R. Correa Oliveira.2008 “Urban transmission of Chagas disease in Cochabamba, Bolivia” *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 103(5): 423-430, August. Pg web: www.memorias.ioc.fiocruz.br
10. MOLLINEDO Sergio, Brutus Laurent, Schneider Dominique, Postigo Jorge, Santalla José, Salas A., Castillo H., Michel G. y Díaz V.2005. ”Chagas Congénito” *Revista Médica* 11 (2).
11. ALBARRACÍN-VH et al.1999 ”Chagas Disease, Bolivia”.*Rev. Saúde Pública* 33(3). Pág.230-236. Pg web: www.fsp.usp.br/-rsp

12. UMEZAWA Eufrosina S., Bastos Sueli F., Coura José R., Levin Mariano J., Gonzalez Antonio, Rangel-Aldao Rafael, Zingales Bianca, Luquetti Alejandro O. and da Silveira Jose Franco. "An improved serodiagnostic test for Chagas' disease employing a mixture of *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens" *Rev. Transfusion Complications* 91- Volume 43.2003.
13. UMEZAWA, ES, Corbett CE, Shikanai-Yasuda MA, Stolf AM. "Chagas' disease". *Lancet* 2001;357:797-9.
14. DA SILVEIRA, JF, Umezawa ES, Luquetti AO.2001."Chagas' disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis". *Trends Parasitology*. 17:286-91.
15. UMEZAWA Eufrosina S., Luquetti Alejandro O., Levitus Gabriela, Ponce Carlos, Ponce Elisa, Henriquez Diana, Revollo Susana, Espinoza Bertha, Sousa Octavio, Khan Baldip and da Silveira José Franco."Serodiagnosis of Chronic and Acute Chagas' Disease with *Trypanosoma cruzi* Recombinant Proteins: Results of a Collaborative Study in Six Latin American Countries" *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 42, No. 1. Jan. 2004, p. 449–452
16. OPS. 2002." Iniciativa de Salud del Cono Sur":-XI^a Reunión de la Comisión Intergubernamental para la Eliminación de T. INFESTANS y la Interrupción de la Transmisión de la Tripanosomiasis Americana Transfusional. OPS/HCP/HCT/02.216, Asunción.
17. UMEZAWA Eufrosina S., José Franco Da Silveira. 1 999. "Serological diagnosis of Chagas disease with purified and defined *Trypanosoma cruzi* antigens" *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 94(1): 285-288. Pg web: www.memorias.ioc.fiocruz.br
18. UMEZAWA Eufrosina S., Aparecida Shikanai Yasuda Maria, Gruber Arthur, Pereira Chioccola Vera L., Zingales Bianca. 1 996. "*Trypanosoma cruzi* defined antigens in the serological evaluation of an outbreak of acute Chagas' disease" *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 91: 87-93. Pg web: www.memorias.ioc.fiocruz.br
19. STOLF, M. A. 1 992. "*Trypanosoma cruzi* antigen in serodiagnosis". ISBT.Sao Paulo-Brasil.

20. NORIVAL Kesper, Jr., De Almeida Katia A., Stolf Anna Maria, and Umezawa Eufrosina S. 2000. "Immunoblot Analysis of Trypomastigote Excreted-Secreted Antigens as a Tool for the Characterization of *Trypanosoma cruzi* Strains and isolates" *J. Parasitology*. 86(4) 862-867
21. UMEZAWA Eufrosina, M. S. Nascimento and A. M. Stolf. 2001. "Enzyme-linked immunosorbent assay with *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens (TESA-ELISA) for serodiagnosis of acute and chronic Chagas' disease" *Rev. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 39. Pág. 169-176
22. PONCE, C., Ponce, E., Vinelli, E., Montoya, A., de Aguilar, V., Gonzales, A., Zingales, B., Rangel-Aldao, R., Levin, M., Esfandiari, J., Umezawa, E.S., Luquetti, A.O., da Silveira, J.F. 2005. "Validation of a Rapid and Reliable Test for Diagnosis of Chagas' Disease by detection of *Trypanosoma cruzi* – Specific Antibodies in Blood of Donors and Patients in Central America". *J Clin Microbiol* 43:5065-5068.
23. REY, Luis. 2001 "Tripanossomíase por *Trypanosoma cruzi* (Doença de Chagas): O Parasito"- *Parasitología-Parasitos e Doenças parasitárias do homem nas Américas e na África*. 3era. Ed.-Editora Guanabara Koogan S.A...Pg.152.
24. MARTÍNEZ Alonso, J.R., Millán Santos, I., Fernández Ayuso, B. 1999. "Conceptos estadísticos utilizados en el diseño e interpretación de trabajos de investigación". Madrid. *Rev. Emergencias*. 11:223-234.
25. GARCÍA Romero, Horacio, Faure Fontanela Amparo y Gonzales Gonzales Alfredo. 2003. "Metodología de la Investigación en Salud". Ed. McGraw-Hill Interamericana. Pág. 31-32.
26. NAKAZAWA Mineo, Rosa Daniela S., Pereira Valéria R. A., Moura Milena O., Furtado Veridiana C., Souza Wayner V., Barros Maria Das Neves D.S., Abath Frederico Q.C., y Gomes Yara M. 2001. "Excretory-Secretory Antigens of *Trypanosoma cruzi* are potentially useful for Serodiagnosis of Chronic Chagas' Disease". *Rev. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 8(5)1024-1027.
27. Iniciativa de la OPS/OMS, Red VIVAS, RIE y Red APA. 2002 "Control de la Enfermedad de Chagas a través del mejoramiento de la vivienda en Provincia Sud-Yungas" La Paz, Bolivia.

28. GERALDO Attilio De Carli. 2007. -"Selección de Métodos y Técnicas de Laboratorio para el Diagnóstico de las Parasitosis Humanas"-Parasitología Clínica- 2ª Ed.-Editorial Atheneu. -Pg. 337.
29. YERUSHALMY J. "Statistical problems in assessing methods of medical diagnosis, with special reference to X-Ray Techniques". *Pub Health Rep* 1947: 62: 1432-49)
30. ABATE, Teresa ."Antígenos recombinantes de *Trypanosoma cruzi*"*.Archivos Venezolanos de Medicina Tropical. Vol 1 N°1. Junio 1997*
31. FELICIANGLI, M., D., Campbell-Lendrum, C. Martinez, D. Gonzalez, P. Coleman, and C. Davies. 2003. Chagas' disease control in Venezuela: lessons for the Andean region and beyond. *Trends Parasitol.* 19:44-49.
32. FERREIRA, A., W., . R. Belem, E. A. Lemos, S. G. Reed, and A. Campos-Neto. 2001. Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of Chagas' disease employing a *Trypanosoma cruzi* recombinant antigen that consists of four different peptides. *J. Clin. Microbiol.* **39**:4390-4395.
33. LEVIN, M.J., Levitus G., Kerner N., Lafon S., Schijman A., Levy Yeyati P., Finkielstfin C., Chiale P., Schejtman D., Hontebeyrie-Joskowicz M. 1990. "Autoantibodies in Chagas'Heath Disease: Possible markers of severe Chagas'hearth complaint" *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, Vol.85(4): 839-843.*
34. UMEZAWA ES., Bastos S.F., Camargo M.E. 1999. "Evaluation of Recombinant antigens of Chagas' disease serodiagnosis in South and Central America" *J. Clin. Microbiol.* 37(5):1554-60.

ANEXOS

ANEXO 1. Porcentaje de resultados por método de ELISA con EAE para *T. cruzi*

RESULTADO	ELISA- EAE	%
POSITIVOS	22	24.4
NEGATIVOS	52	57.8
DUDOSOS	16	17.8
TOTAL	90	100

Porcentaje de resultados por método de IFI para *T. cruzi*

RESULTADO	IFI	%
POSITIVOS	35	38.89
NEGATIVOS	55	61.11
DUDOSOS	0	0
TOTAL	90	100

Distribución porcentual de seroreactividad por método de ELISA-EAE y el método de IFI para *T. cruzi*

RESULTADO	ELISA-EAE	%	IFI	%
POSITIVO	22	24.4	35	38.89
NEGATIVO	52	57.8	55	61.11
DUDOSO	16	17.8	0	0
TOTAL	90	100	90	100

ANEXO 2. Porcentaje de resultados serológicos según método de ELISA con H 49 para *T. cruzi*

RESULTADO	ELISA- H 49	%
POSITIVOS	27	30

NEGATIVOS	57	63.3
DUDOSOS	6	6.7
TOTAL	90	100

Relación porcentual de resultados obtenidos por los métodos de ELISA con H 49 y ELISA-EAE e IFI

RESULTADO	ELISA- H 49	%	ELISA-EAE	%	IFI	%
POSITIVOS	27	30	22	24.4	35	38.89
NEGATIVOS	57	63.3	52	57.8	55	61.11
DUDOSOS	6	6.7	16	17.8	0	0
TOTAL	90	100	90	100	90	100

ANEXO 3. Porcentaje de resultados según método de ELISA con JL 8 para *T. cruzi*

RESULTADO	ELISA-JL 8	%
POSITIVOS	26	28.9
NEGATIVOS	54	60
DUDOSOS	10	11.1
TOTAL	90	100

Relación porcentual de resultados obtenidos por los métodos de ELISA con JL 8 y con ELISA-EAE e IFI

RESULTADO	ELISA-JL 8	%	ELISA-EAE	%	IFI	%
POSITIVOS	26	28.9	22	24.4	35	38.89
NEGATIVOS	54	60	52	57.8	55	61.11

DUDOSOS	10	11.1	16	17.8	0	0
TOTAL	90	100	90	100	90	100

ANEXO 4. Porcentaje de resultados según método de ELISA con mezcla de Ag Rb (H49+JL8+MAP) para *T. cruzi*

RESULTADO	ELISA-Mix (H49+JL8+MAP)	%
POSITIVOS	19	21.1
NEGATIVOS	65	72.2
DUDOSOS	6	6.7
TOTAL	90	100

Relación porcentual de resultados obtenidos por los métodos de ELISA con Mix de Antígenos Recombinantes (H 49 + JL8 + MAP) y con ELISA-EAE e IFI

RESULTADO	ELISA-Mix AgRb (H49+JL8+MAP)	%	ELISA- EAE	%	IFI	%
POSITIVOS	19	21.1	22	24.4	35	38.89
NEGATIVOS	65	72.2	52	57.8	55	61.11
DUDOSOS	6	6.7	16	17.8	0	0
TOTAL	90	100	90	100	90	100

ANEXO 5. Relación porcentual de resultados obtenidos por los métodos de ELISA con antígeno TESA y con ELISA-EAE e IFI

RESULTADO	ELISA-TESA	%	ELISA- EAE	%	IFI	%
POSITIVOS	19	21.1	22	24.4	35	38.89
NEGATIVOS	71	78.9	52	57.8	55	61.11

DUDOSOS	0	0	16	17.8	0	0
TOTAL	90	100	90	100	90	100

ANEXO 6.- Distribución porcentual de seroreactividad de los diferentes métodos

RESULTADO	EAE	IFI	H49	JL8	H49+JL8+MAP	TESA
POSITIVO	24.40%	38.89%	30%	28.90%	21.10%	21.10%
NEGATIVO	57.80%	61.11%	63.30%	60%	72.20%	78.90%
DUDOSO	17.80%	0%	6.70%	11.10%	6.70%	0%
TOTAL	100%	100%	100%	100%	100%	100%

ANEXO 7. Cálculo de Valores Predictivos para IFI

Valor Predictivo Positivo (VPP):

$$\text{VPP} = \frac{22}{22 + 8} \times 100 = \frac{22}{30} = 0.733 \times 100 = 73.3\%$$

Valor Predictivo Negativo (VPN):

$$\text{VPN} = \frac{51}{51 + 9} \times 100 = \frac{51}{60} = 0.85 \times 100 = 85\%$$

ANEXO 8. Cálculo de Valores Predictivos para H49

Valor Predictivo Positivo (VPP)

$$\text{VPP} = \frac{27}{27 + 1} \times 100 = \frac{27}{28} = 0.96 \times 100 = 96\%$$

Valor Predictivo Negativo (VPN):

$$\text{VPN} = \frac{57}{57 + 5} \times 100 = \frac{57}{62} = 0.92 \times 100 = 92\%$$

ANEXO 9. Cálculo de Valores Predictivos para JL 8**Valor Predictivo Positivo (VPP):**

$$\text{VPP} = \frac{26}{26 + 3} \times 100 = \frac{26}{29} = 0.89 \times 100 = 89\%$$

Valor Predictivo Negativo (VPN):

$$\text{VPN} = \frac{54}{54 + 7} \times 100 = \frac{54}{61} = 0.88 \times 100 = 88\%$$

ANEXO 10. Cálculo de Valores Predictivos para Mix de H49+JL8+MAP

Valor Predictivo Positivo (VPP):

$$\text{VPP} = \frac{19}{19 + 1} \times 100 = \frac{19}{20} = 0.95 \times 100 = 95\%$$

Valor Predictivo Negativo (VPN):

$$\text{VPN} = \frac{65}{65 + 5} \times 100 = \frac{65}{70} = 0.93 \times 100 = 93\%$$

ANEXO 11. Cálculo de Valores Predictivos para TESA-ELISA**Valor Predictivo Positivo (VPP):**

$$\text{VPP} = \frac{18}{18 + 1} \times 100 = \frac{18}{19} = 0.947 \times 100 = 94.7\%$$

Valor Predictivo Negativo (VPN):

$$\text{VPN} = \frac{70}{70 + 1} \times 100 = \frac{70}{71} = 0.986 \times 100 = 98.6\%$$

ANEXO 12.- Comparación entre índices de validés de Prueba Diagnóstica según método.

En trabajos anteriores se determinó que ELISA –EAE tiene una sensibilidad de 92%, mientras que IFI sólo alcanza un 70%. En el presente trabajo se confirmó la sensibilidad del IFI con un 70.9%. En cambio la Especificidad determinada para ELISA-EAE fue sólo del 89%, contra la mejor especificidad de IFI, que tiene un 86.4%. Así, se tiene:

TÉCNICA	ELISA-EAE	IFI	H 49	JL 8	H49+JL8+MAP	TESA
SENSIBILIDAD	92%	70.9%	96.4%	89.6%	95%	95%
ESPECIFICIDAD	89%	86.4%	98.3%	94.7%	98.5%	98.6%
EFICIENCIA	90%	81.1%	93%	89%	93%	97.7%

ANEXO 13. TABLAS DE ESTADÍSTICOS

Estadísticos para la variable H49 por R-EAE/IFI

Grupos	1	2	3
N	57	6	27
Media	0.119	0.337	0.816
Mediana	0.120	0.342	0.710
Moda	0.083	0.216	0.517
Varianza	0.025	0.072	0.112
Desviación típica	0.050	0.085	0.335
Error Estandard	0.007	0.021	0.072
Mínimo	0.021	0.216	0.406
Máximo	0.299	0.405	1.634
p = 0.016 (p<0.05)			

1 = Negativos / 2 = Dudosos / 3 = Positivos

Estadísticos para la variable JL 8 por R-EAE/IFI

Grupos	1	2	3
N	54	10	26
Media	0.119	0.337	0.816

Mediana	0.120	0.342	0.710
Moda	0.083	0.216	0.517
Varianza	0.025	0.072	0.112
Desviación típica	0.050	0.085	0.335
Error Estandard	0.007	0.021	0.072
Mínimo	0.041	0.199	0.398
Máximo	0.297	0.404	1.634
p = 0.031 (p<0.05)			

1 = Negativos / 2 = Dudosos / 3 = Positivos

Estadísticos para la variable H49+JL8+MAP por R-EAE/IFI

Grupos	1	2	3
N	65	6	19
Media	0.113	0.271	0.844
Mediana	0.116	0.277	0.754
Moda	0.116	0.201	0.285
Varianza	0.0019	0.0044	0.169
Desviación típica	0.044	0.066	0.411
Error Estandard	0.006	0.016	0.087
Mínimo	0.025	0.171	0.399
Máximo	0.295	0.398	1.342
p = 0.009 (p<0.05)			

1 = Negativos / 2 = Dudosos / 3 = Positivos

Estadísticos para la variable TESA por R-EAE/IFI

Grupos	1	2	3
N	71	0	19
Media	0.113	0.264	0.830
Mediana	0.114	0.275	0.752
Moda	0.072	0.307	0.287
Varianza	0.0021	0.0044	0.169
Desviación típica	0.044	0.0014	0.159
Error Standard	0.006	0.016	0.087
Mínimo	0.022	0.000	0.403
Máximo	0.297	0.000	1.342
p = 0.000 (p<0.05)			

1 = Negativos / 2 = Dudosos / 3 = Positivos

**ANEXO 14.- PREPARACIÓN DE SOLUCIONES A UTILIZAR EN LOS
DIFERENTES MÉTODOS**

✓ **SOLUCIÓN DE PBS (Ph 7.2)**

a) Preparación de la Solución Madre: Tampón Fosfato 0.01 M pH 7.2)

- 4.27 g. de Na₂HPO₄ para 2 litros
- 1.2 g. de NaH₂PO₄ para 1 litro

Se mezclan ambas soluciones para llegar a una concentración de 0.01 M.

Se ajusta el pH a 7.2 utilizando las mismas soluciones.

b) Preparación de la Solución de Trabajo:

Se realiza una dilución 1/100 a partir de la Solución Madre en solución fisiológica al 0.9% (9 g. de NaCl diluidos en 1000 ml de H₂O destilada)

✓ **SOLUCIÓN TAMPÓN CARBONATO 0.1 M (Ph 9.6)**

- 0.0335 g. Na_2CO_3
- 0.14145 g. NaHCO_3
- 20 ml de agua destilada para cada uno de los reactivos

Disolver los reactivos con el agua y mezclarlos, verificando concentración de 0.1M. Ajustar el pH a 9.6

✓ **TAMPÓN CARBONATO – BICARBONATO 0.05 M (Ph 9.6)**

- 0.106 g. de Na_2CO_3 para 20 ml de agua destilada.
- 0.084 g. de NaHCO_3 para 20 ml de agua destilada.

Se mezclan ambas soluciones para llegar a una concentración de 0.05 M. Se ajusta el pH a 9.6 con las mismas soluciones. Luego, se enrasa a 100 ml con agua destilada.

✓ **TAMPÓN CITRATO – FOSFATO 0.05 M (Ph 5.0)**

- 1.065 g. de Na_2HPO_2 para 150 ml. de agua destilada
- 1.71 g. de Ácido Cítrico di-hidratado para 150 ml. de agua destilada.

Mezclar ambas soluciones para llegar a una concentración de 0.05 M. Ajustar el pH a 5.0 con HCl ó NaOH p.a. según resulte el ph.

✓ **SOLUCIÓN DE REVELADO (Revelador)**

- 5.0 mg. De OPD (Orthophenilendiamine)
- 12.5 ml de tampón fosfato – citrato 0.05 M (pH5.0)
- 7 ul de H_2O_2 al 30%

Pesar el OPD, tomando las precauciones necesarias por tratarse de un compuesto químico altamente cancerígeno. Usar guantes y barbijo.

Disolver bien lo pesado en el tampón fosfato – citrato.

Mezclar con el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) sólo al momento de revelar la reacción de la placa, por tratarse de una reacción rápida.

Proteger la solución de la luz (por ejemplo, con papel estañado)

✓ **SOLUCIÓN DE HANKS WALLACE (Ph 7.4)**

- 4.0 g. de Na Cl
- 0.3 g. de K Cl
- 0.3 g. de KH_2PO_4
- 0.04 g. de Mg_2SO_4
- 0.029 g. de Na_2HPO_4
- 0.125 g. $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
- 0.49 g. de $NaHCO_3$
- 0.5 g. de Glucosa
- C.s.p. de agua destilada para 500 ml de solución.

Disolver en el mismo orden todos y cada uno de los reactivos, poco a poco con el agua destilada.

----- 0 -----