

UTILIDAD DE LAS MUESTRAS RECOGIDAS EN PAPEL SECANTE Y LAS PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO RÁPIDO PARA EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN FASE CRÓNICA

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

21 DE JUNIO DE 2019

LIDIA GUAL GONZÁLEZ

DIRECTORA: ELENA SULLEIRO

Máster en Zoonosis y One Health – 2018-2019

Trabajo final de máster

**Utilidad de las muestras recogidas en papel secante y las
pruebas de diagnóstico rápido en el diagnóstico
serológico de la Enfermedad de Chagas en fase crónica.**

Máster en Zoonosis y One Health – 2018-2019

Autora: Lídia Gual González

Directora: Elena Sulleiro

Agradecimientos:

A Aroa Silgado, por su paciencia y la gran ayuda que me ha dado. Al equipo de técnicos del laboratorio del Hospital Vall d'Hebrón. A Elena Sulleiro, por ofrecerme la oportunidad de realizar este trabajo.

Índice

Resumen.....	1
1. Introducción	2
1.1 Enfermedad de Chagas.....	2
1.2 Epidemiología.....	2
1.3 Ciclo vital del parásito	4
1.4 Patogenia.....	5
1.5 Clínica	6
1.6 Diagnóstico.....	6
1.6.1 Técnicas parasitológicas.....	6
1.6.2 Técnicas serológicas	7
1.7 Tratamiento.....	9
1.8 Futuros proyectos	9
2. Objetivos	11
3. Material y métodos	12
3.1 Población de estudio.....	12
3.2 Técnica del papel secante	12
3.3 Detección de anticuerpos IgG anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
3.4 Test de Detección Rápida (PDR).....	13
3.5 Análisis estadísticos.....	14
4. Resultados	16
4.1 Pruebas serológicas realizadas a partir de muestras recogidas en papel secante:	16
4.1.1 CLIA a partir de papel secante vs suero.	16
4.1.2 ELISA en papel secante vs suero.	19
4.2 Prueba rápida:.....	19
4.2.1 PDR vs serología en suero.	19
4.2.2 PDR vs CLIA en muestras papel secante.....	20
5. Discusión	21

6. Limitaciones del estudio.....	25
7. Conclusiones.....	26
8. Futuras aplicaciones	27
9. Referencias.....	28

Resumen

La enfermedad de Chagas (EC) está causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*. Este parásito se transmite por distintas vías, mediante insectos vectores, de forma vertical de madres infectadas a su descendencia, por transfusión de hemorderivados o trasplante de órganos y de forma más anecdótica por, vía oral y accidentes de laboratorio. La enfermedad de Chagas es endémica en el continente latinoamericano, donde se localiza el chinche vector. La epidemiología de la EC está cambiando debido a los movimientos migratorios de las áreas endémicas a países receptores donde se ha convertido en un problema de salud. La enfermedad cursa de dos fases, aguda y crónica. El diagnóstico de la fase aguda se basa en técnicas parasitológicas mientras que en fase crónica se basa en técnicas serológicas. Este estudio quiere establecer la sensibilidad y especificidad del diagnóstico serológico de EC en pacientes crónicos, mediante la obtención de muestras de sangre en papel secante, así como mediante la utilización de pruebas inmunocromatográficas rápidas (PDR). Se han analizado 128 muestras recogidas en papel secante de pacientes en fase crónica de la EC. Estas muestras se analizaron mediante un ensayo de quimioluminiscencia (CLIA) y un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Los resultados obtenidos mostraron una sensibilidad de CLIA en papel secante de 98.92% con una concordancia con los resultados en suero de 0.978 y del ELISA en papel secante de 77.08% con una concordancia de 0.609. Se observó una especificidad del 100% en ambas pruebas. Por otra parte, a 100 pacientes (51 de ellos analizados también mediante muestras en papel secante) se les realizó la PDR. La PDR mostró una sensibilidad relativa de 91.89% y especificidad del 100% y una concordancia con las pruebas serológicas de 0.855 y con la técnica de papel secante de 0.853. Estos resultados nos sugieren que la realización de CLIA en muestras obtenidas en papel secante es un buen método diagnóstico de EC con resultados comparables a los obtenidos en suero. La PDR es un método muy sencillo y accesible desde el punto de vista comunitario, pero presenta una menor sensibilidad.

1. Introducción

1.1 Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es una enfermedad infecciosa causada por el parásito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Es un protozoo de la familia *Trypanosomatidae*, del género *Trypanosoma*. Dentro de este género encontramos diferentes especies, entre ellas hay ciertas especies que causan patogenicidad en animales y dos de ellas relevantes también en humanos: *Trypanosoma cruzi*, causante en humanos de la enfermedad de Chagas (o tripanosomiasis americana), y *Trypanosoma brucei* causante de la enfermedad del sueño (o tripanosomiasis africana) en humanos, y la enfermedad de nagana en mamíferos (1).

1.2 Epidemiología

La infección por *T. cruzi* afecta aproximadamente a 8 millones de personas en el mundo. A pesar de ello está clasificada entre las enfermedades desatendidas por la OMS (1). La infección por *T. cruzi* se transmite por distintas vías: vectorial mediante insectos vectores de la subfamilia *Triatominae*, que contiene más de 150 especies eficientes (2). Además de la vectorial hay otras formas de transmisión de la infección: de forma vertical de madres infectadas a su descendencia, mediante transfusión de hemoderivados o trasplante de órganos de donante seropositivo a receptor seronegativo, y de forma más anecdótica por vía oral al ingerir heces infectadas del insecto vector y, en algunos casos también se ha transmitido por accidentes de laboratorio (3,4).

La transmisión vectorial se produce únicamente en América latina, donde la Enfermedad de Chagas es endémica, 21 países de centro y Sudamérica exceptuando las islas del Caribe (5). Los triatominos suelen vivir en ambientes domésticos cerca de regiones tropicales. Se encuentran escondidos en grietas y entre las paredes de las casas viejas, en las zonas rurales y suburbanas principalmente de baja renta. Los países que se consideran endémicos son aquellos en que hay presencia del vector (Latinoamérica), pero esto no impide la propagación de la enfermedad a otros países (6). La epidemiología de la enfermedad depende en gran medida de la distribución del vector y de las tendencias migratorias de personas procedentes de países endémicos (7) (Imagen 1). Actualmente es un problema emergente de salud pública en países de

Europa y Estados Unidos, muy notablemente en España, el país con más inmigrantes latinoamericanos de Europa (8).

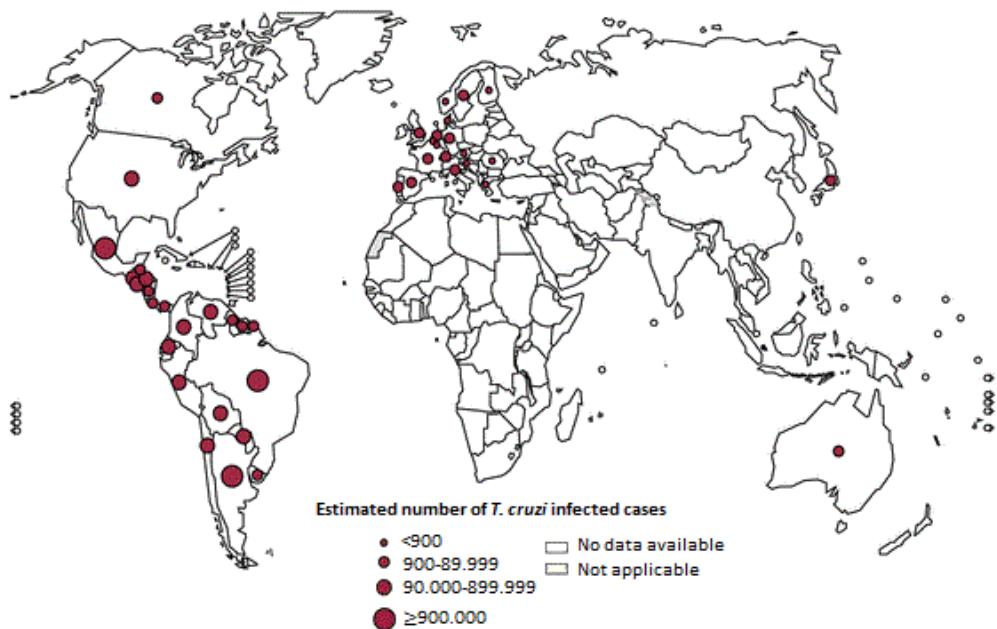


Imagen 1. Distribución de la infección por *T. cruzi* según datos de la OMS publicados del año 2008.

Estas tendencias son representadas por personas jóvenes, principalmente mujeres, relevantes para la transmisión congénita de la enfermedad. Fuera de Latinoamérica, el mayor número de casos nuevos aparecen de forma congénita (6,9). Los programas dirigidos a la detección precoz de la EC en mujeres en edad fértil y el tratamiento precoz de los recién nacidos infectados son actualmente medidas útiles para disminuir la incidencia de la enfermedad (10). Por otra parte el tratamiento de las mujeres en edad fértil es la única medida preventiva eficaz de la transmisión congénita y que refuerza la necesidad de cribar toda la población (11).

En Catalunya desde el año 2010 existe un programa de control de cribaje y diagnóstico en embarazadas por parte de la Generalitat de Catalunya para ayudar a controlar la transmisión congénita (12). Otro de los importantes cambios en la incidencia de la EC ha sido la implementación de los protocolos de cribado de la infección en donantes de sangre. En España existe un Real Decreto (RD 1088/2005) que obliga a hacer cribado en los donantes de sangre para evita la transmisión mediante transfusión. El cribado de

donantes de órganos provenientes de Latinoamérica es también obligatorio para evitar la transmisión por medio del trasplante (13).

1.3 Ciclo vital del parásito

El ciclo vital de *T. cruzi* es complejo y tiene diferentes formas en los insectos vectores o en los hospedadores mamíferos. En el ciclo encontramos tres formas morfológicas diferentes de *T. cruzi*, dos en el humano y una en el vector. El parásito circula entre vectores y mamíferos, y presenta una amplia variabilidad genética y antigénica que permite clasificarlo en 6 linajes o unidades discretas de tipificación (DTU), de TcI a TcVI. La diversidad genética se relaciona con la zona geográfica, la distribución, patogénesis, la clínica y la respuesta al tratamiento (14).

El ciclo comienza cuando el vector triatomino ingiere el parásito, en forma de tripomastigote circulante en sangre del mamífero o humano hospedador. En el intestino medio del vector, los tripomastigotes se transforman a epimastigotes, donde se desarrolla el estado replicativo en el invertebrado. Los epimastigotes viajan hasta el intestino posterior, donde se diferencian en tripomastigotes metacíclicos infectivos, que se excretaran en las heces del vector. Los tripomastigotes metacíclicos, entran a través de la herida de la picadura, o de la membrana mucosa intacta del hospedador mamífero, invadiendo todo tipo de células, preferentemente de origen mesenquimal (10). Una vez están en el citoplasma, los tripomastigotes se diferencian en amastigotes intracelulares, por división binaria, en un tiempo de replicación de 12h en un período de 4-5 días. Al final de este ciclo replicativo, los amastigotes se transforman de nuevo en tripomastigotes, lisan las células, y se liberan en el torrente sanguíneo. El sistema circulatorio les permite llegar a las células diana, principalmente tejido muscular y miocardio (4,15) (Imagen 2).

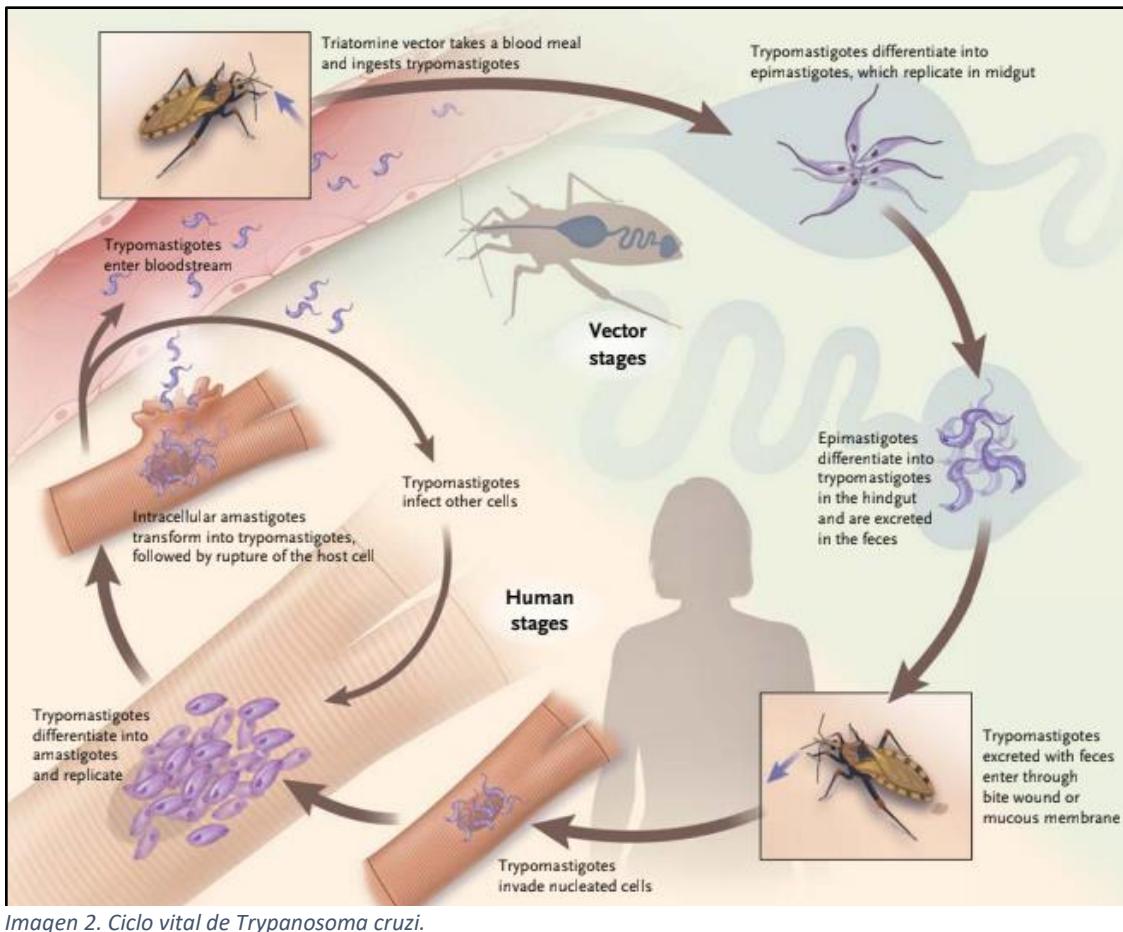


Imagen 2. Ciclo vital de *Trypanosoma cruzi*.

1.4 Patogenia

La enfermedad de Chagas presenta dos fases clínicas, la fase aguda y la fase crónica. En la fase aguda, hay un momento inicial en el que los triatomastigotes infectivos se encuentran dentro de leucocitos y células de tejidos subcutáneos. Se sigue de una diseminación mediante el sistema linfático y sanguíneo hasta los distintos tejidos. La mayor concentración de los parásitos está en el músculo esquelético, miocardio y células ganglionares. La fase aguda ocurre en cualquier momento de la vida, más a menudo en la infancia, y en muchos casos es asintomática. El período de incubación es de unos 8-10 días (1-2 semanas) suele mantenerse por unas 4-8 semanas, a los 90 días disminuye la parasitemia (10).

Esta fase se sigue de una fase crónica. Ésta empieza unos 2-3 meses después de la infección inicial y se caracteriza por una baja e intermitente parasitemia. Generalmente es asintomática y de años de evolución. Podría ocurrir la reactivación de la enfermedad de Chagas, en los pacientes crónicos que desarrollen un sistema inmunitario comprometido, por coinfección de VIH o fármacos inmunosupresores. El otro 30-40%

de los pacientes, desarrollaran alguna involucración orgánica en los siguientes 10-30 años después de la infección aguda: principalmente cardiomielitis o mega-víscera (megacolon, megaesófago o ambos) (4,10,15).

1.5 Clínica

FASE AGUDA. La forma más frecuente es asintomática. En caso de presentar síntomas, los más frecuentes son fiebre, inflamación en el sitio de inoculación (chancro de inoculación), edema palpebral unilateral (signo de Romaña), linfadenopatía, y hepatoesplenomegalia. Las miocarditis severas se desarrollan raramente; las muertes por enfermedad de Chagas aguda son mayoritariamente por un fallo cardíaco (15).

FASE CRÓNICA. La fase crónica es asintomática en un 60-70% de los pacientes. Los pacientes de fase crónica sintomáticos desarrollaran alguna involucración orgánica en los siguientes 10-30 años después de la infección aguda: en más frecuencia desarrollan cardiomielitis y menos frecuentemente desarrollan patología del sistema gastrointestinal, megacolon, megaesófago o ambos. Aunque la fase crónica sea asintomática requieren una evaluación clínica de las posibles complicaciones viscerales anual (4,10,15).

1.6 Diagnóstico

Debido a las diferencias en la parasitemia, las técnicas diagnósticas son diferentes en la fase aguda y la fase crónica (Imagen 3).

1.6.1 Técnicas parasitológicas.

Para la fase aguda, se realizan técnicas parasitológicas que tienen como objetivo detectar al parásito en sangre periférica:

1.- Técnicas directas clásicas como el examen directo de los tripomastigotes en sangre. Se realiza mediante examinación microscópica de sangre fresca anticoagulada o de la capa leucopláquetar. Las técnicas por concentración permiten aumentar la sensibilidad, como el microhematócrito, técnica de elección en el diagnóstico de la infección congénita o la técnica de Strout, que concentra los parásitos en sangre sin anticoagulante (37°C, 1h) mediante tres centrifugaciones a diferentes velocidades, quedando los tripomastigotes suspendidos en el sobrenadante (13).

2.- Técnicas de amplificación natural, como el hemocultivo, o el xenodiagnóstico (13).

3.- También se usan técnicas moleculares como PCR o LAMP que se encuentran disponibles con alta sensibilidad y especificidad (16). El hecho que haya casos asintomáticos hacen que esta enfermedad esté infradiagnosticada (13,17).

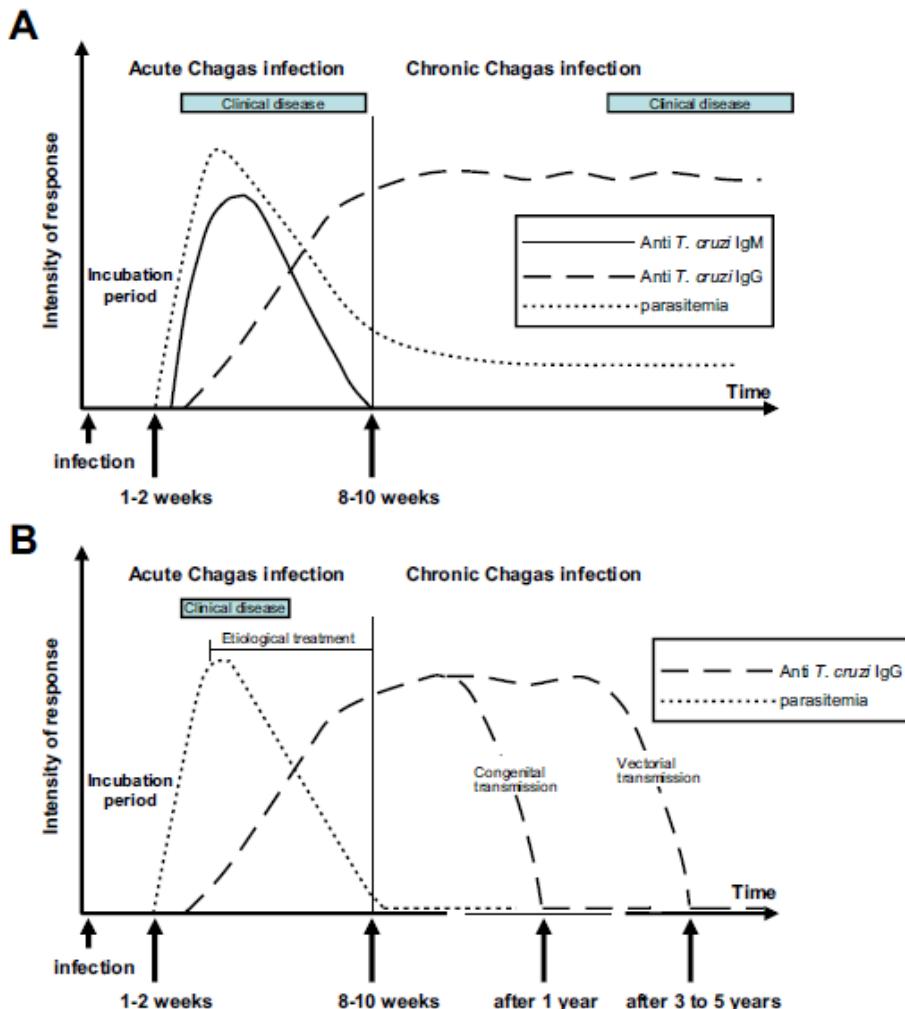


Imagen 3. Comparativa serológica de la evolución de la infección por enfermedad de Chagas aguda. Diferencias entre pacientes sin tratar (A) y pacientes tratados y curados (B).

Durante la fase crónica la parasitemia disminuye, mientras que aumenta la concentración de anticuerpos Ig G, anti-*T. cruzi*. Debido a esto el diagnóstico mediante métodos parasitológicos o moleculares disminuye altamente su sensibilidad.

1.6.2 Técnicas serológicas

En esta fase, el diagnóstico se basa en la detección de anticuerpos específicos frente a *T. cruzi* (15). Tenemos diferentes técnicas en uso: las técnicas convencionales y las no convencionales.

Las técnicas convencionales:

1.- Con parásito entero como antígeno. La inmunofluorescencia indirecta (IFI) en la que observamos la unión del anticuerpo específico a un marcador fluorescente;

2.- Con mezcla de antígenos: La hemoaglutinación indirecta (HAI) por antígenos de superficie; los ensayos inmunoenzimáticos como el ensayo ligado a enzimas (ELISA) que producen coloración medida por espectrofotometría; el ensayo ligado a quimioluminiscencia (CLIA) que capta la reacción quimioluminiscente por un fotomultiplicador (13,18).

El diagnóstico serológico no convencional utiliza antígenos purificados, recombinantes o péptidos sintéticos. Dentro de este último grupo, destacan las pruebas rápidas en formato de tiras inmunocromatográficas y la aglutinación en tarjeta (13).

El diagnóstico serológico de EC consta de la realización de dos técnicas de distinto principio (Imagen 4). Si ambas técnicas son positivas, el diagnóstico de EC es positivo, mientras que, si ambas técnicas son negativas, el diagnóstico es negativo. En caso de obtener 1 positivo y 1 negativo, se considerará discordante y se deberá repetir la prueba. Si se mantiene la incertidumbre se realizará una tercera prueba para determinar el resultado final (19).

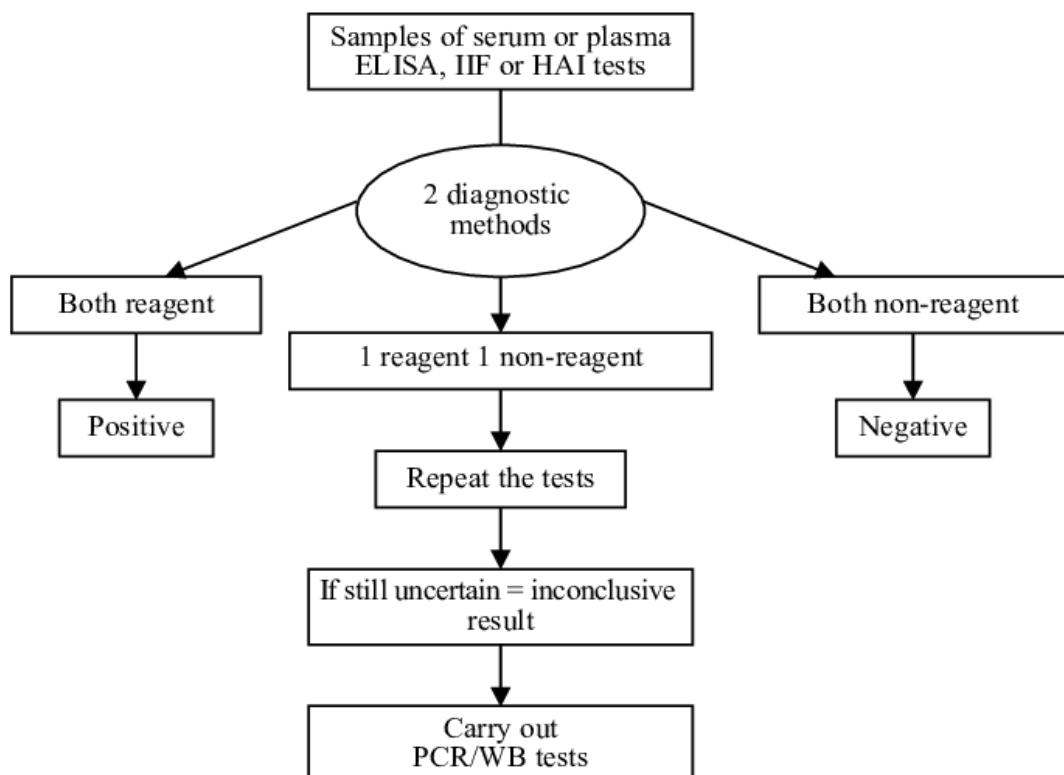


Imagen 4. Esquema diagnóstico serológico de enfermedad de Chagas, según recomendaciones de la OMS. La tercera prueba de confirmación en caso de discordancia, no está especificada por la OMS (19).

Actualmente ya existen estudios que sugieren que el diagnóstico serológico podría reducirse a una sola técnica de alta sensibilidad y especificidad como son las técnicas de quimioluminiscencia (CLIA) (8).

1.7 Tratamiento

Existen solamente dos fármacos, Nifurtimox y Benznindazol (20). Benznindazol es el que se considera tratamiento de primera línea en nuestro medio. Estos fármacos tienen una elevada toxicidad y una eficacia mayor para pacientes en la fase aguda. El tratamiento se recomienda en pacientes que se encuentran en fase aguda o con Chagas congénito, niños con enfermedad de Chagas crónico menores de 18, y en casos de reactivación de la enfermedad. Ambos tratamientos reducen la gravedad de los síntomas, acortan la clínica y reducen la duración de la parasitemia. La cura en fase aguda tiene un éxito de entre el 80 y 90%. El tratamiento en pacientes crónicos está recomendado debido a que reduce la progresión de la cardiomiopatía, disminuyen la mortalidad, y reducen la probabilidad de transmitir la enfermedad de forma vertical si se trata a las mujeres en edad fértil antes del embarazo (10,20).

El único marcador de curación es la constatación de la pérdida de los anticuerpos por métodos serológicos. Los métodos parasitológicos, incluida la PCR, no permiten descartar la infección, pero un resultado positivo es considerado un fracaso de tratamiento. Actualmente la PCR es el mejor y más rápido marcador de fallo de respuesta al tratamiento (21).

1.8 Futuros proyectos

Actualmente en España hay un gran número de población inmigrante procedente de Latinoamérica sin diagnosticar de enfermedad de Chagas (12). No existe actualmente un programa establecido para cribaje, dejando en manos del médico la decisión de realizar la prueba. Esto junto a las barreras económicas, culturales o de estigmatización de la enfermedad, se reduce la realización de la prueba, y se estima una pérdida de hasta el 90% de los diagnósticos (22). Una buena manera de combatir eso, es intentar acercar el diagnóstico al paciente ofreciendo el cribado en las farmacias comunitarias de Barcelona. El objetivo es crear un cribado de la enfermedad de Chagas en farmacias comunitarias, para facilitar el acceso de los pacientes a las pruebas de cribado y

aumentar el número de pacientes que se hacen la prueba. Para ello es necesario un método de cribaje rápido y que no requiera aparataje ni presente complejidad técnica. Para ello se utilizará una prueba rápida, y posteriormente enviar las muestras de sangre al laboratorio mediante papel secante para la confirmación serológica. La técnica elegida debe ser lo suficientemente sensible para descartar los casos negativos, y detectar los positivos, dándoles la opción de acceder al tratamiento de la enfermedad, controlar y reducir la transmisión congénita (5,6).

2. Objetivos

El objetivo principal del trabajo es valorar la implementación de un método de diagnóstico rápido y fiable de Enfermedad de Chagas en fase crónica en las farmacias comunitarias de Barcelona.

Los objetivos específicos:

- Determinar la utilidad de las pruebas serológicas realizadas en muestras de sangre recogida en papel secante y la prueba rápida para diagnosticar la enfermedad de Chagas.
- Evaluar la sensibilidad y especificidad de las técnicas serológicas convencionales (ELISA y quimioluminiscencia), usando como muestra la recuperación en PBS de los anticuerpos en papel secante.
- Evaluar la sensibilidad y especificidad de las pruebas rápidas para detectar anticuerpos anti-*T.cruzi*.

3. Material y métodos

3.1 Población de estudio.

El criterio de definición de pacientes positivos para EC en fase crónica se realizó mediante una prueba quimioluminiscencia (CLIA) que utiliza anticuerpos recombinantes y una segunda prueba serológica mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA) con anticuerpos nativos, ambas a partir de suero (Imagen 5).

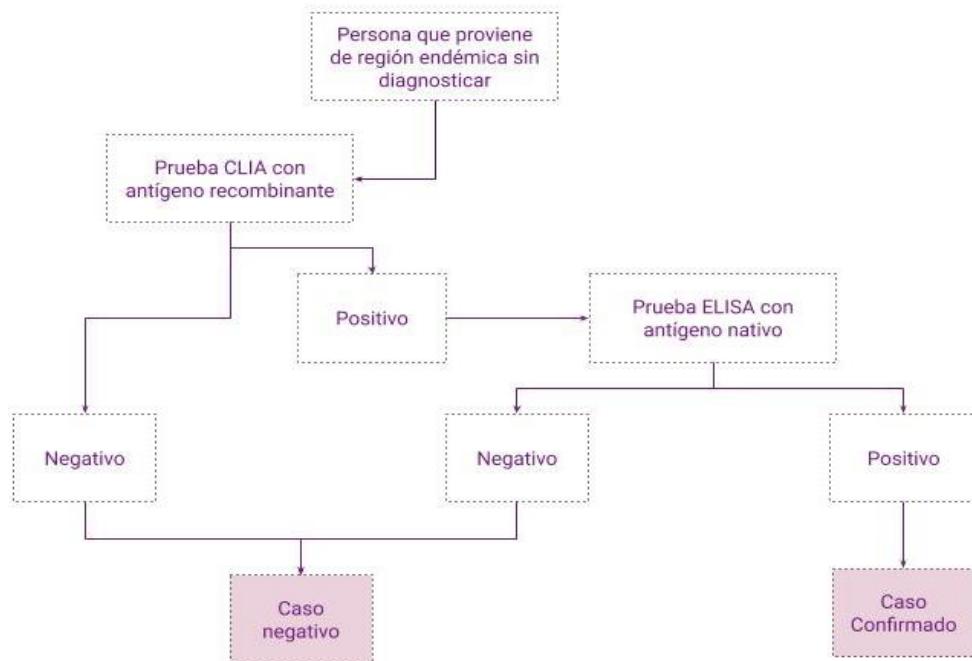


Imagen 5. Algoritmo para el diagnóstico de infección de *T.cruzi* utilizado en zona no endémica, para pacientes de Enfermedad de Chagas en fase crónica

3.2 Técnica del papel secante

Las muestras de sangre se impregnaron en papel secante tipo *Whatman* (*Sigma-Aldrich*, Alemania) de 8 mm de grosor, llenando 2 círculos con 50 µL de sangre por cada círculo. Los papeles impregnados se dejaron secar durante la noche a temperatura ambiente. Seguidamente se recortaban los círculos, se introducían en tubos *eppendorf* añadiendo 300 µL de PBS i se dejaban incubar durante la noche en agitación a temperatura ambiente. Por último, se extraía el excedente del papel *Whatman* con cuidado y se mantenía el eluido a 4°C en la nevera hasta su procesamiento.

3.3 Detección de anticuerpos IgG anti-*Trypanosoma cruzi*.

La presencia de IgG se determinó a partir de las muestras de eluido usando dos técnicas que utilizan antígeno recombinante: el ELISA CHAGAS ELISA IgG+IgM (Vircell

Microbiologists, Granada) y el ensayo de CLIA *Elecsys Chagas* (*Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania*). En 13 muestras el ensayo ELISA utilizado fue *Ortho-T. cruzi ELISA* (*Ortho T.cruzi ELISA, Johnson & Johnson, High Wycombe, Reino Unido*).

Para realizar la técnica ELISA se atemperaron los reactivos a temperatura ambiente. El método ELISA se basa en la reacción de los anticuerpos de la muestra con un antígeno recombinante de *T. cruzi*. Se realizó según el procedimiento indicado por el fabricante, usando un método automatizado con el equipo DS2 ELISA Processor (Dynex Technologies), y procediendo a la lectura mediante espectrofotómetro en 450/620nm. Cada ensayo utiliza un control positivo (>0.9), un control negativo (<0.5) y control *cut off* (>0.55 ; <1.5). estos controles permiten validar la prueba y el equipo. Las densidades ópticas (D.O) de los controles deben estar en los rangos descritos y en caso contrario se desechará la prueba. Los resultados se interpretan calculando la media de las D.O del suero *cut off*. Índice de anticuerpos = (D.O de la muestra/ media de D.O del suero *cut off*) $\times 10$. Si el índice es <9 , es negativo, si se encuentra entre 9-11 es dudoso y >11 es positivo. Los resultados dudosos deben ser analizadas de nuevo, los índices inferiores a 9 se consideran que no tienen anticuerpos frente a *T. cruzi*.

Para la técnica CLIA se usó el analizador automático de muestras COBAS 8000 (Roche Diagnostics), que realiza la prueba y la lectura por electro-quimioluminiscencia. El equipo Cobas 8000 nos indica el resultado en el índice de corte (COI) de forma automática. El criterio que sigue es mediante la identificación correcta de las muestras negativas y positivas. Las muestras con un COI ≥ 1.0 : son resultado reactivo, positivas para anticuerpos anti-*T. cruzi*; las muestras con un COI < 1.0 : son no reactivas, y por tanto negativas para anticuerpos anti-*T. cruzi*.

3.4 Prueba de Detección Rápida (PDR).

Cómo técnica de detección rápida se usó una prueba inmunocromatográfica basada en la utilización de un antígeno recombinante multi epítopo patentado *Trypanosoma Detect™* (*InBIOS, Seattle, US*).

Para la realización de la técnica, retiramos la tira de prueba del paquete y añadimos posteriormente 20 μL de sangre total a la tira reactiva en la zona del área absorbente. Separadamente añadimos 3-4 gotas (150-200 μL) de amortiguador en un tubo de

prueba, colocamos la tira dentro en posición vertical de forma que la parte que contiene la sangre entra en contacto con el amortiguador. En pocos segundos observamos la migración del oro coloidal y leemos los resultados posteriormente.

Se define un valor positivo el que tiene dos bandas, considerando las líneas de prueba tenues como positivas (Imagen 6).



Imagen 6. PDR Trypanosoma Detect en muestras de sangre. a. Muestra positiva tenue. b. Muestra positiva clara c. Muestra negativa.

3.5 Análisis estadísticos.

Para los análisis descriptivos realizamos una descriptiva general de las variables expresadas mediante las medianas y el rango intercuartílico (IQR).

Para evaluar la utilidad del papel secante, se compararon los resultados de las técnicas serológicas ELISA y CLIA obtenidas del papel secante, con la técnica CLIA en suero, que definimos como técnica de referencia. Para ello se hizo una prueba no paramétrica U de Mann Whitney entre el CLIA en papel secante con la técnica de referencia. Se calcularon la sensibilidad relativa (verdaderos positivos/total positivos) y especificidad relativa (falsos positivos/total negativos) de cada una de las técnicas. Se obtuvieron los valores predictivos positivo y negativo, y el coeficiente kappa de Cohen con intervalo de confianza (IC) de 95%, para evaluar la concordancia entre cada una de las pruebas.

Para evaluar las PDR se obtuvo la sensibilidad relativa (verdaderos positivos/total positivos) entre los valores de las PDR, y los valores de referencia de la CLIA. También se compararon mediante un contraste de frecuencias los porcentajes de positivos del CLIA en papel secante y la PDR.

Todos los cálculos se realizaron utilizando el programa estadístico R mediante R Studio.

4. Resultados

Se analizaron un total de 128 muestras sanguíneas provenientes de 96 pacientes positivos, 29 negativos y 3 discordantes, según el algoritmo diagnóstico. Las tres muestras discordantes no se tuvieron en cuenta para los cálculos posteriores de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN, que se calculó en base a una n final de 125 muestras: 96 seropositivas y 29 seronegativas para *T. cruzi*.

Para la valoración de la prueba rápida se evaluaron 100 pacientes, 51 incluidos en la valoración anterior.

4.1 Pruebas serológicas realizadas a partir de muestras recogidas en papel secante:

Para la prueba diagnóstica de quimioluminiscencia (CLIA) a partir de muestras de papel secante se obtuvo un resultado inválido en 3 de las muestras, descartándose para los cálculos, considerando para estos una n=122.

4.1.1 CLIA a partir de papel secante vs suero.

Se obtuvieron 92/122 (75.4%) resultados positivos y 30/122 (24.6%) negativos por técnica CLIA a partir de muestras de papel secante. La única discrepancia con la técnica realizada en suero fue una muestra negativa a partir de papel secante que era positiva en suero, y que se consideró un falso negativo.

Los valores de índice *cut-off* (COI) de mediana con rango intercuartílico (IQR) de CLIA en suero para el grupo de positivos fue 241.7(192.6- 282.02) mientras que para CLIA en papel secante fue 138.1(71.71-204.4) ($p=4.827 \times 10^{-11}$). La distribución de los valores de ambas metodologías se representó mediante diagrama de cajas (Imagen 7).

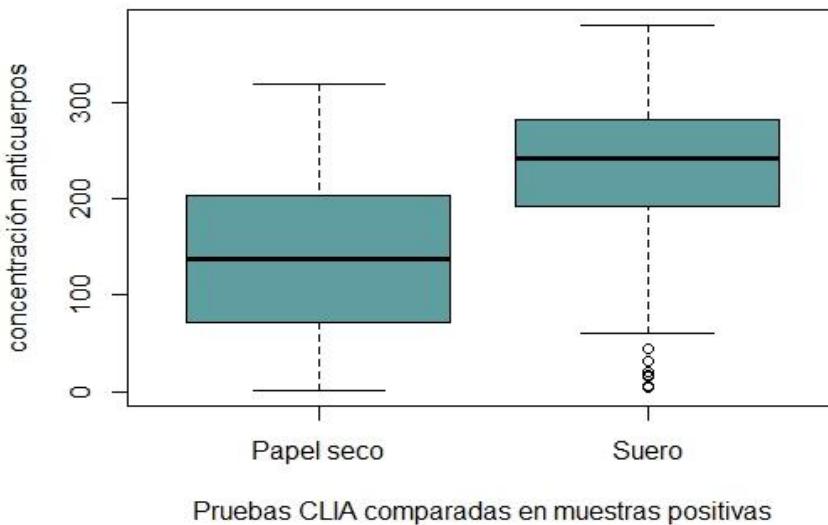


Imagen 7. Diagrama de cajas de los valores de la concentración de anticuerpos de las muestras de papel secante y los niveles de anticuerpos de las muestras en suero, provenientes de los pacientes positivos para T. cruzi.

Los resultados de capacidad predictiva, de la sensibilidad relativa, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo están descritos en la Tabla 1.

Para los resultados de la concordancia entre la prueba realizada partir de papel secante y sueros, obtuvimos un valor de kappa con una fuerza de concordancia muy buena de 0.978 (Tabla 1).

El p valor obtenido al comparar los resultados positivos por ambas técnicas fue de 0.06734.

Tabla 1. Valores de capacidad predictiva de CLIA en papel secante, según los valores en suero.

MEDIDA	Prueba CLIA en papel secante	
	Resultado (%)	95% IC
Sensibilidad relativa	98.92	93.31-99.94
Especificidad relativa	100	85.44-99.69
Valor predictivo positivo	100	95.01-99.90
Valor predictivo negativo	96.67	80.95-99.83
Índice kappa	0.978	0.934-1.021

También se realizó un análisis por separado de las muestras que presentaban niveles bajos de anticuerpos (<100) y niveles altos (>100) observándose una diferencia en el comportamiento del valor de los anticuerpos. Las muestras que presentan niveles bajos de anticuerpos seguían un patrón lineal muy claro, mientras que en concentraciones altas de anticuerpos el patrón lineal es distinto, y con valores más dispersos (Imagen 8).

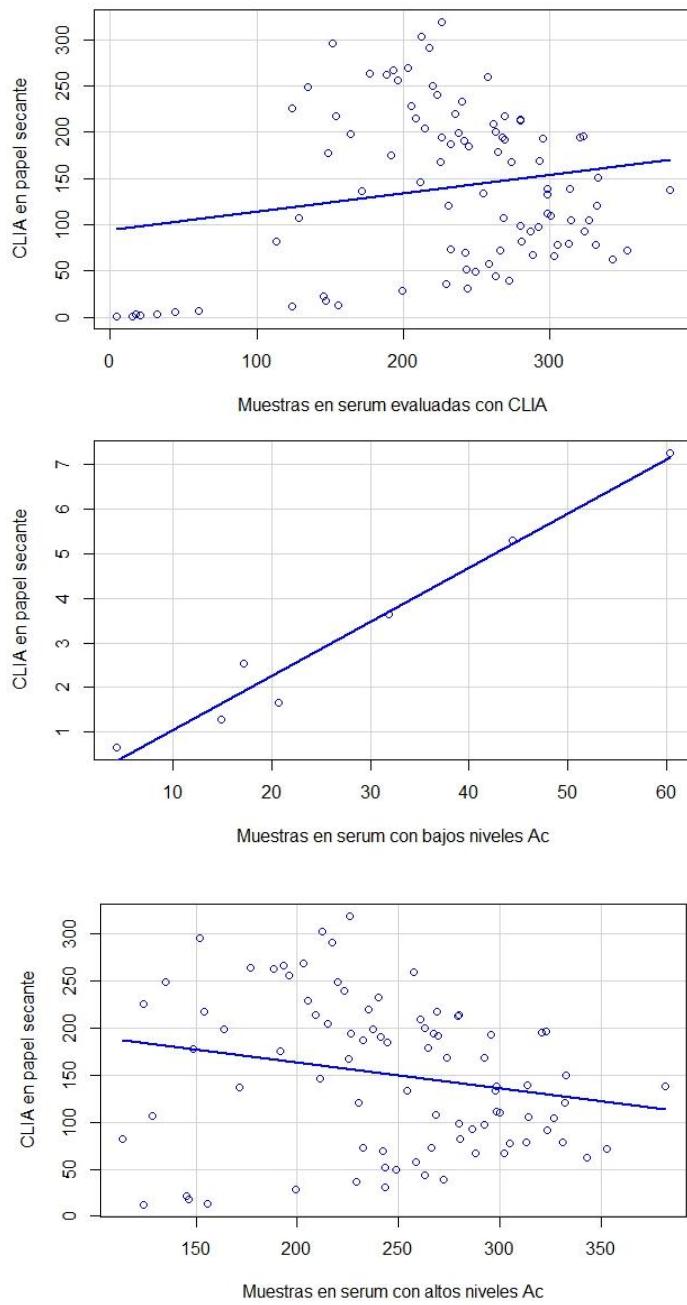


Imagen 8. Gráficas de dispersión de puntos de los valores positivos entre las muestras de papel secante y las muestras en suero. Arriba, todas las muestras positivas. En medio, muestras con niveles de anticuerpos ≤ 100 . Abajo, muestras con niveles de anticuerpos >100 .

4.1.2 ELISA en papel secante vs suero.

Para la prueba diagnóstica ELISA en muestras de papel seco se analizaron 125 muestras (n=125).

Se obtuvieron 74/125 (59.2%) muestras positivas y 51/125 (40.8%) negativas realizando ELISA a partir de muestras de papel secante. Las discrepancias con la técnica realizada en suero se, fueron 22 muestras negativas a partir de papel secante que eran positivas en suero, y por tanto se consideró un falso negativo (Tabla 2).

Tabla 2. Tabla con los resultados de positivos y negativos de la técnica de referencia con la técnica ELISA en papel secante.

Técnica de referencia			
ELISA en papel secante	Positivos	Negativos	Total
Positivos	74	0	74
Negativos	22	29	51
Total	96	29	125

Los valores D.O de mediana (IQR) de ELISA en papel secante fue 1.483(1.075-1.922). Los resultados de la capacidad predictiva, sensibilidad relativa, especificidad relativa y valores predictivos positivo y negativo están descritos en la Tabla 3. Para los resultados de la concordancia entre las dos pruebas obtuvimos un valor de kappa de 0.609(Tabla 3)

Tabla 3. Valores de la capacidad predictiva de la técnica ELISA en papel secante según los valores en suero

MEDIDA	Prueba ELISA en papel secante	
	Resultado (%)	95% IC
Sensibilidad relativa	77.08	67.17-84.79
Especificidad relativa	100	85.44-99.69
Valor predictivo positivo	100	93.85-99.88
Valor predictivo negativo	56.86	42.32-70.37
Índice kappa	0.609	0.461-0.758

4.2 Prueba rápida:

4.2.1 PDR vs serología en suero.

De las 100 muestras analizamos la sangre mediante la PDR, obtuvimos 68/100 (68%) positivos. Seis de ellos 6/68 (8.8%) tenían una banda positiva tenue (Imagen 6) y 32/100 (32%) fueron negativos. Se observaron discordancias entre la PDR y el suero en 6 (6%) muestras. Todas ellas fueron positivas en la muestra de suero y negativas para PDR considerándose falsos negativos (Tabla 4).

Tabla 4. Valores positivos y negativos de la técnica CLIA en suero y la prueba rápida comparados.

PDR	Técnica de referencia		
	Positivos	Negativos	Total
Positivos	68	0	68
Negativos	6	26	32
Total	74	26	100

Los resultados de la capacidad predictiva, sensibilidad relativa, especificidad relativa y valores predictivos positivo y negativo están en la Tabla 5. Para la concordancia entre las dos pruebas obtuvimos una fuerza de concordancia de 0.855.

Tabla 5. Tabla con los valores de la capacidad predictiva de la prueba y valor kappa de concordancia con la serología.

MEDIDA	Prueba Trypanosoma Detect	
	Resultado (%)	95% IC
Sensibilidad relativa	91.89	82.57-96.66
Especificidad relativa	100	83.98-99.65
Valor predictivo positivo	100	93.34-99.87
Valor predictivo negativo	81.25	62.95-92.14
Índice kappa	0.855	0.742-0.967

4.2.2 PDR vs CLIA en muestras papel secante.

De las 100 muestras analizadas mediante PDR, 51 fueron evaluadas paralelamente mediante CLIA en papel secante. De estos 51, 22 (43.2%) fueron positivos y 29 (56.8%) negativos mediante PDR. Si se comparan estos resultados con los observados en CLIA papel secante, hay tres muestras discordantes. Las tres muestras fueron positivas por CLIA en papel secante y negativa por PDR (Tabla 6). Para la fuerza de concordancia entre las dos pruebas obtuvimos un valor kappa de concordancia de 0.853 (0.710-0.995).

Tabla 6. Tabla de contingencia de los valores positivos y negativos según la prueba PDR, y según la prueba CLIA en muestras de papel secante.

PDR	CLIA en muestras papel secante		Total
	Positivos	Negativos	
Positivos	22	-	22
Negativos	3	26	29
Total	25	26	51

5. Discusión

En este estudio se pretende determinar la utilidad de las pruebas de diagnóstico rápido y las muestras recogidas en papel secante para su implementación en un programa de cribado comunitario. Para ello, en primer lugar, ha sido necesario determinar la utilidad del papel secante como método de transporte de muestras de sangre para la determinación de Ac anti-*Trypanosoma cruzi* por técnicas serológicas convencionales, y encontrar el método serológico más sensible a partir de esta técnica.

En muestras de suero convencionales el CLIA ha demostrado ser la técnica serológica más sensible (8). De hecho, entre las muestras seleccionadas para nuestro estudio existían tres muestras discordantes que presentaban resultado positivo por CLIA y negativo por ELISA debido a la diferencia de sensibilidad de ambas técnicas.

La alta sensibilidad del CLIA podría suponer un cambio en el algoritmo diagnóstico propuesto por la OMS. En dos estudios basados en los resultados de CLIA y que fueron realizados en España, proponen utilizar una sola técnica de alta sensibilidad y especificidad (CLIA) tanto para descartar la infección como para hacer el diagnóstico definitivo. Para ello, proponen un cambio en el punto de corte que permita detectar verdaderos positivos sin necesidad de la realización de una segunda técnica. En el estudio de Pérez-Ayala y colaboradores sugieren CLIA como única técnica diagnóstica, con confirmación en casos en que el valor de corte (S/CO) sea ≤ 3.80 (23). En el artículo de Abras y colaboradores aumentan el valor S/CO ≤ 6 . Según los resultados obtenidos en estos estudios, únicamente las muestras por debajo del nuevo punto de corte requerirían confirmación. Este cambio en el algoritmo diagnóstico propone reducir costes y tiempo, en el diagnóstico y cribaje de los pacientes crónicos importados (8).

En caso de las muestras recogidas en papel secante, la serología realizada por CLIA en nuestro estudio presenta una sensibilidad de 98.92% con una concordancia del 0.978 con la misma técnica en suero. Además, los resultados de la dispersión de los valores de niveles de anticuerpos altos en CLIA papel secante y suero, nos sugieren que el comportamiento de la técnica ante diferentes concentraciones de anticuerpos, tanto en papel secante como en suero, son semejantes.

A pesar de los buenos resultados, la mediana de los valores COI en suero 241.7(192.65-282.02) es mayor que en papel secante con COI 138.1(71.71-204.4).

Existe solo un estudio donde evalúan la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* mediante papel secante (24). De forma semejante a los resultados obtenidos en nuestro estudio, Holguín y colaboradores en su estudio realizado en el área endémica, detectaron un valor de corte del CLIA en suero S/CO es de 6.5(0.04-10.50), mayor a las muestras de papel secante 2.6 (0.66-7.18) (24). La diferencia de sensibilidad podría ser debida a la dilución de la muestra de papel secante en PBS, necesaria para poder recuperar los anticuerpos del papel.

En el caso de muestras con COI cercanos al punto de corte, la menor sensibilidad de la muestra en papel secante podría hacer perder casos. En nuestro estudio, la muestra con un resultado negativo en papel secante (COI 0.66) tiene niveles de anticuerpo en suero muy bajos (COI 4.32). Al solo tener un falso negativo, no se puede evaluar correctamente mediante una curva de característica operativa del receptor (ROC).

Los resultados en papel secante de la técnica CLIA tienen una mayor sensibilidad (98.92%) que los obtenidos por ELISA (77.08%). Además de una mayor concordancia en CLIA (0.855) comparada con los resultados del ELISA, que muestra una concordancia de 0.609. Esto nos sugiere una menor calidad de la prueba si evaluamos muestras de papel secante mediante ELISA.

En un estudio en el cual se querían detectar anticuerpos anti-*Plasmodium falciparum* en muestras de sangre en papel secante, la técnica ELISA se realizaba sin dilución previa en PBS (25). En este estudio Gibson y colaboradores observaron una sensibilidad de 94% en ELISA en papel secante con una especificidad del 89%. Si bien no se trata de *T. cruzi*, los resultados presentan una mejor sensibilidad que los de nuestro estudio, y podría ser debido a no diluir previamente para resuspender los anticuerpos.

La menor sensibilidad de la serología en papel secante respecto al suero puede suponer un aumento de muestras discordantes e inválidas. El papel secante, puede dejar restos y crear interferencias en los lectores. Las muestras de tres pacientes (2.3%) no pudieron ser analizadas por el CLIA. Al utilizar bajos volúmenes de PBS para resuspender los anticuerpos para perder la mínima sensibilidad, las posibilidades de repetición son

mínimas. Los equipos de CLIA requieren un importante volumen muerto que limitan las posibilidades de relectura. No hubo errores de lectura mediante la técnica de ELISA.

En el caso de pacientes con bajos niveles de anticuerpos la técnica realizada en papel secante puede dar falsos negativos. En los tres casos discordantes analizados, dos de los tres casos, fueron detectados como negativos mediante papel secante. El tercer caso discordante fue detectado como positivo en la muestra de papel secante con COI muy bajo de 2.97 en papel vs 30.92 en suero. Holguín y colaboradores a partir de una muestra mayor con 151 pacientes, decidieron establecer un COI más bajo (≥ 0.88) en las muestras de papel secante que en las de suero.

En el estudio de Holguín y cols. tomando un COI de ≥ 1 la: sensibilidad fue de 95.2% y la especificidad de 84.1%, mientras que tomando el COI de ≥ 0.88 , su sensibilidad fue de 98.8% y especificidad de 71.6%. Al comparar los resultados de ambos estudios la sensibilidad obtenida es similar, pero no la especificidad. Podría explicarse porque el estudio de Holguín y colaboradores está realizado en el área endémica donde es posible padecer otro tipo de infecciones que puedan dar a reactividad cruzada.

En nuestro estudio, además, intentamos implementar el cribaje mediante pruebas de diagnóstico rápido (PDR).

La sensibilidad de las PDR difiere por áreas geográficas debido a diferencias en la seroprevalencia y la posibilidad de reacciones cruzadas. Las PDR se han usado de forma fiable en zonas de alta prevalencia y transmisión de la enfermedad, pero, disminuye la sensibilidad, en regiones donde hay menos transmisión (26). En nuestro estudio, encontramos valores de, sensibilidad de 91.89% con una especificidad del 100%. En un estudio de Egüez y sus colaboradores realizado en el área endémica, la sensibilidad de las PDR llegaba al 100%. Los autores consideran mejor validar cada PDR en la zona donde se implementará. La menor sensibilidad de las PDR encontrada en nuestro estudio puede deberse a que la mayoría de los pacientes presentaban la forma indeterminada de Enfermedad de Chagas, con niveles de anticuerpos más bajos.

Existen múltiples PDR diseñadas para el diagnóstico serológico de la EC. En un estudio de Sánchez-Camargo y colaboradores, hacen una comparativa de 11 PDR en 474 muestras de sangre de diferentes áreas geográficas, comparando por lo menos 3

pruebas rápidas. La prueba *Trypanosoma detect* Rapid test (*InBIOS, Seattle, US*) tuvo una sensibilidad de 92.9% y especificidad de 93.2%, y concordancia con prueba serológica de 0.86 en región no endémica. Debido a estos buenos resultados y a su facilidad de uso, esta fue la técnica seleccionada para el cribaje(27).

Al comparar el resultado de las PDR con la prueba de quimioluminiscencia en muestras de papel secante, se obtenía una identificación final del 100% de los casos con una concordancia entre técnica PDR y papel secante muy buena de 0.853. la toma de muestra en papel secante es un buen complemento de la PDR, permitiendo aumentar las posibilidades diagnósticas sin necesidad de una extracción de sangre venosa convencional para obtención de suero.

Las técnicas de diagnóstico rápido son fáciles, sencillas de realizar e interpretar y no requieren equipamiento lo que las hace idóneas para un programa de cribado comunitario.

6. Limitaciones del estudio

El número de muestras analizado en el estudio ha sido limitado. Aumentando el número, los resultados estadísticos serían más robustos.

Dado el escaso número de muestras con bajos niveles de anticuerpos, no ha sido posible obtener un valor de corte óptimo, para poder obtener resultados fiables en esos pacientes cuyos niveles de anticuerpos son muy bajos.

No pudimos analizar la reactividad cruzada con otras especies de parásitos como *Leishmania spp.* o pacientes de *Plasmodium spp.* y evaluar la sensibilidad y especificidad de la técnica en estos casos.

7. Conclusiones

Para el cribado comunitario de la EC crónica, es una buena estrategia realizar una PDR y recoger muestras en papel secante para la posterior confirmación sin necesidad de una extracción de sangre venosa convencional para obtención de suero.

El papel secante es un buen método de transporte de muestras, siendo un sistema fácil, rápido y que no requiere de condiciones específicas de temperatura.

A pesar de los buenos resultados de sensibilidad y especificidad, las técnicas serológicas en papel secante presentan menor sensibilidad que en suero.

La técnica de CLIA presenta una mejor sensibilidad que el ELISA en muestras obtenidas en papel secante.

La PDR es una buena técnica para hacer un primer cribado ya que es fácil y de sencillo uso e interpretación, pero su sensibilidad es menor que la de la serología convencional.

8. Futuras aplicaciones

Este estudio servirá para la aplicación de proyecto piloto de cribado comunitario de enfermedad de Chagas, en pacientes procedentes de región endémica, en farmacias de Barcelona.

En un futuro se debería realizar un estudio de evaluación de la reactividad cruzada que pueda aparecer, en pacientes con diagnósticos de otras enfermedades parasitarias, y poder establecer un diagnóstico más fiable.

También podría servir para optimizar el método de diagnóstico de enfermedad de Chagas, obteniendo un método más rápido y menos costoso, con la confirmación necesaria solamente en un porcentaje de casos pequeña.

Además, este estudio puede inspirar la realización de técnicas PDR con serología en papel secante para otras enfermedades en las que la disponibilidad de diagnóstico esté más al alcance de la población comunitaria, permitiendo mejor acceso a los pacientes.

9. Referencias

1. World Health Organization. WHO | What is Chagas disease [Internet]. 2016 [cited 2019 Jun 5]. Available from: <https://www.who.int/chagas/disease/en/>
2. Barreto Vieira C, Reis Praça Y, Bentes KL da S, Santiago PB, Marcelino Martins Silva S, dos Santos Silva G, et al. Triatomines: Trypanosomatids, Bacteria, and Viruses Potential Vectors? *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8(405):1–12.
3. Howard EJ, Xiong X, Carlier Y, Sosa-Estani S, Buekens P. Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: A systematic review and meta-analysis. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol.* 2014;121(1):22–33.
4. Bern C. Chagas' Disease. *N Engl J Med.* 2015;373(5):456–66.
5. Stanaway JD, Roth G. The Burden of Chagas Disease. *Glob Heart* [Internet]. 2019;10(3):139–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ghart.2015.06.001>
6. Albajar-Viñas P, Jannin J. The hidden Chagas disease burden in Europe [Internet]. Vol. 16, Euro Surveillance. 2011. p. 1–3. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19975>
7. Pellegrino A. Migration from Latin America to Europe: trends and policy challenges. IOM Migr Res Ser [Internet]. 2004;(16). Available from: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Migration+from+Latin+America+to+Europe++trends+and+policy+challenges#0>
8. Abras A, Llovet T, Tebar S, Herrero M, Berenguer P, Ballart C, et al. Serological Diagnosis of Chronic Chagas Disease : Is It Time for a Change? *J Clin Microbiol.* 2016;54(6):1566–72.
9. Basile L, Jansà JM, Carlier Y, Salamanca DD, Angheben A, Bartoloni A, et al. Chagas disease in European countries : the challenge of a surveillance system. Vol. 16, Euro Surveillance. 2008. p. 1–10.
10. Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. *Lancet.* 2018;391:82–94.
11. Murcia L, Simón M, Carrilero B, Roig M, Segovia M. Treatment of Infected Women of Childbearing Age Prevents Congenital *Trypanosoma cruzi* Infection by Eliminating the Parasitemia Detected by PCR. *J Infect Dis* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2019 Jun 20];215(9):1452–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28201741>

12. Ciruela P, Basile L, Jané M, Requena A, Valls ME, Gallego M, et al. Programa de prevenció i control de la malaltia de Chagas congènita a Catalunya Sub-direcció General de Vigilància i Resposta a Emergències de Salut Pública Desembre de 2018. Agència Salut Pública Catalunya Dep Salut [Internet]. 2018; Available from: http://canalsalut.gencat.cat/web/.content/_A-Z/C/chagas/documents/arxius/protcolcribratgeidiagnostic.pdf
13. Flores-chávez M, de Fuentes I, Gárate T, Cañavate C. Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas importada. Enfermedades Infect Microbiol clínica. 2007;25(S3):29–37.
14. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. Infect Genet Evol [Internet]. 2012;12(2):240–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>
15. Rassi Jr A, Rassi A, Marcondes de Rezende J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). Infect Dis Clin North Am. 2012;26:275–91.
16. Martínez I, Cervantes-landín A, Espinoza B. Diagnóstico molecular de la enfermedad de Chagas. Biol Mol y Med. 2013;149(3):363–5.
17. Schijman AG. Molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi*. Acta Trop [Internet]. 2018;184:59–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.02.019>
18. Organization WH. WHO Definitions related to Chagas disease diagnosis [Internet]. Chagas disease. 2016. p. 1. Available from: https://www.who.int/chagas/home_diagnosis_more_definitions/en/
19. Moure Z, Sulleiro E, Iniesta L, Guillen C, Molina I, Alcover MM, et al. Acta Tropica The challenge of discordant serology in Chagas disease : The role of two confirmatory techniques in inconclusive cases. Acta Trop. 2018;185(May):144–8.
20. Bern C, Montgomery SP, Herwaldt BL, Marin-neto JA, Maguire JH, Acquatella H, et al. Evaluation and Treatment of Chagas Disease in the United States. J Am Med Assoc. 2007;298(18):2171–81.
21. Gomes YM, Lorena VMB, Luquetti AO. Diagnosis of Chagas disease: What has been achieved? what remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104(SUPPL. 1):115–21.

22. Monge-Maillo B, López-Vélez R. Challenges in the management of Chagas disease in Latin-American migrants in Europe. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2017 May [cited 2019 Jun 18];23(5):290–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28428122>
23. Pérez-Ayala A, Frajeda I, Rebollo L, Lora-Pablos D, Lizasoain M, Herrero-Martínez JM. Usefulness of the ARCHITECT Chagas® assay as a single test for the diagnosis of chronic Chagas disease. *Trop Med Int Heal.* 2018;23(6):634–40.
24. Holguín A, Norman F, Martín L, Mateos ML, Chacón J, López-Vélez R, et al. Dried Blood as an Alternative to Plasma or Serum for *Trypanosoma cruzi* IgG Detection in Screening Programs. *Clin Vaccine Immunol.* 2013;20(8):1197–202.
25. Gibson LE, Markwalter CF, Kimmel DW, Mudenda L, Mbambara S, Thuma PE, et al. Plasmodium falciparum HRP2 ELISA for analysis of dried blood spot samples in rural Zambia. *Malar J.* 2017;16(1):1–10.
26. Egüez KE, Alonso-padilla J, Terán C, Chipana Z, García W, Torrico F, et al. Rapid diagnostic tests duo as alternative to conventional serological assays for conclusive Chagas disease diagnosis. *PLoS Negl trop Dis.* 2017;11(4):1–11.
27. Sánchez-Camargo CL, Albajar-Viñas P, Wilkins PP, Nieto J, Leiby DA, Paris L, et al. Comparative evaluation of 11 commercialized rapid diagnostic tests for detecting *Trypanosoma cruzi* antibodies in serum banks in areas of endemicity and nonendemicity. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2014 Jul 1 [cited 2019 Jun 20];52(7):2506–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24808239>