



INSTITUTO
NACIONAL DE
SALUD

RECOMENDACIÓN TÉCNICA SOBRE EL USO DE MÉTODOS ELISA PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN COLOMBIA

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. INS
ACTUALIZACION 2022

Elaborado por: Maryi Lorena Segura Alba
Grupo de Parasitología - Subdirección
Laboratorio Nacional de Referencia

Revisado por: Clara del Pilar Zambrano Hernandez - Martha
Stella Ayala Sotelo – Liliana Jazmin Cortes Cortes
Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia

Aprobado por: Astrid Carolina Florez Sanchez
Directora Técnica de Redes en Salud Publica



MINISTERIO DE SALUD
Y PROTECCIÓN SOCIAL

Elaborado por:

Maryi Lorena Segura Alba

Profesional Universitario, Grupo de Parasitología – Dirección de Redes en Salud Pública

MARTHA STELLA AYALA SOTELO

Coordinadora Grupo de Parasitología – Dirección de Redes en Salud Pública

CLARA DEL PILAR ZAMBRANO HERNANDEZ

Subdirectora Laboratorio Nacional de Referencia – Dirección de Redes en Salud Pública

El documento requirió revisión por la Oficina Asesora de Jurídica SI NO X

El documento requirió revisión por una instancia externa asesora SI NO X ¿Cuál?

© 2022-12

Instituto Nacional de Salud

Bogotá, Colombia

Av. Calle 26 No. 51-20

Tabla de contenido

1. Validación secundaria y verificación del desempeño de siete pruebas de ELISA-2017.....	4
1.1. Descripción del estudio y metodología	4
1.2. Parámetros a verificar	5
1.3. Procesamiento analítico	5
1.4. Recolección y procesamiento de datos	5
1.5. Resultados de la verificación secundaria 2017	5
2. Validación secundaria y verificación del desempeño de una prueba de ELISA-2020	7
3. Conclusiones	9
4. Recomendaciones	10
5. Algoritmo de diagnóstico serológico para la Enfermedad de Chagas	12
6. Bibliografía	13

1. Validación secundaria y verificación del desempeño de siete pruebas de ELISA - 2017.

1.1. Descripción del estudio y metodología

Con el fin de aportar a la eliminación de las barreras en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, en el año 2017 se realizó un estudio analítico de verificación o validación secundaria, el cual tuvo como objetivo general evaluar el rendimiento diagnóstico de siete métodos de ELISA (convencionales de extractos antigénicos totales y no convencionales de antígenos recombinantes y péptidos sintéticos) disponibles comercialmente para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas en Colombia. Se estimaron sus características operativas, mediante comparación con criterio de verdad (estándar de referencia) configurado por caracterización serológica con diferentes metodologías del Laboratorio Nacional de Referencia, caracterización clínica y epidemiológica de 501 muestras de suero de pacientes colombianos, donantes de sangre y materiales de referencia internacionales.

Posteriormente a la estimación de las características operativas se compararon los resultados mediante aplicación de pruebas múltiples, por metodología en serie y en paralelo, con el fin de evaluar cuales de las técnicas cumplirían con el criterio de aceptación y de esta manera rediseñar el lineamiento de diagnóstico serológico que existe a nivel nacional, mejorándolo en desempeño y oportunidad, ofreciendo a los pacientes un diagnóstico con validez y calidad para el inicio de un tratamiento integral.

La evaluación se realizó dentro de las instalaciones del Instituto Nacional de Salud (INS), en el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) grupo de Parasitología, el cual tiene disponible infraestructura, equipos, insumos, personal idóneo y suficiente para tal fin.

El estudio se realizó con el apoyo de la Dirección de Redes en Salud Pública del Instituto Nacional de Salud -Grupo de Parasitología de la Subdirección del Laboratorio Nacional de Referencia, Dirección de Enfermedades Transmitidas por Vectores del Ministerio de Salud y Protección Social y el apoyo de Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi).

1.2. Parámetros a verificar

En el estudio de verificación se estimaron los siguientes parámetros con sus intervalos de confianza al 95%: sensibilidad, especificidad, exactitud, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, razón de verosimilitud positivo y razón de verosimilitud negativo, sin embargo, solo la sensibilidad y la especificidad fueron objeto de comparación, debido a que ninguna técnica de ELISA en sus insertos manifiestan los demás parámetros ni intervalos de confianza.

1.3. Procesamiento analítico

En las instalaciones del LNR grupo de Parasitología del INS se realizó el procesamiento por laboratorio de 501 muestras de suero por cada una de las técnicas seleccionadas para la verificación; los montajes o corridas se realizaron siguiendo: recomendaciones operativas de cada fabricante en sus insertos, estándares de calidad en relación con reactivos y muestras, además de la respectiva trazabilidad metrológica para cada uno de los equipos, control de calidad, monitoreo y control de las condiciones ambientales (temperatura y humedad relativa).

1.4. Recolección y procesamiento de datos

Posterior al procesamiento de las muestras, los resultados obtenidos fueron tabulados en una base de datos diseñada para tal fin, utilizando hojas de cálculo Excel, creando tablas de contingencia por cada una de las técnicas de ELISA, se estimaron posteriormente las características operativas y se realizaron las pruebas múltiples con el paquete estadístico Epidat 3.1 (Programa para el análisis Epidemiológico de Datos de la Organización Panamericana de la Salud).

1.5. Resultados de la verificación secundaria 2017

Las siguientes son las características operativas de siete técnicas ELISA para la detección de anticuerpos anti -*T. cruzi*, obtenidas en el estudio de verificación del grupo de Parasitología del INS (tabla1).

Tabla 1. Características operativas de siete técnicas de ELISA para el diagnóstico serológico de la Enfermedad de Chagas

Nombre de test	Fabricante del test	Sensibilidad* (IC95%)	Especificidad* (IC95%)	Exactitud (IC95%)	VPP** (IC95%)	VPN** (IC95%)	LR+ (IC95%)	LR- (IC95%)
Chagas ELISA IgG+IgM®	Vircell Ag recombinantes	99,61 % (98,65 – 100)	97,55 % (95,41 – 99,69)	98,60 % (97,48 – 99,73)	97,70 % (95,69 – 99,71)	99,58% (98,56 – 100)	40,67 (18,45 – 89,65)	0,00 (0,00 – 0,03)
Test ELISA Chagas III®	Grupo Bios Ag totales	99,22 % (97,94 – 100)	97,96 % (95,98 – 99,93)	98,60% (97,48 – 99,73)	98,07 % (96,20 – 99,94)	99,17 % (97,83 – 100)	48,62 (20,42 – 115,77)	0,01 (0 – 0,03)
Chagatest ELISA recombinante v 4.0®	Wiener Lab Ag recombinantes	98,83 % (97,31 – 100)	97,96 % (95,98 – 99,93)	98,40 % (97,21 – 99,60)	98,06 % (96,19 – 99,94)	98,77 % (97,17 – 100)	48,43 (20,34 – 115,31)	0,01 (0,00 – 0,04)
ARCHITECT Chagas®	Abbott Ag recombinantes	98,44% (96,72 – 100)	97,96% (95,98 – 99,93)	98,2% (96,94 – 99,47)	98,05% (96,17 – 99,94)	98,36% (96,56 – 100)	48,23 (20,26 – 114,86)	0,02 (0,01 -0,04)
Bioelisa Chagas®	Biokit S.A Ag recombinantes	98,05 % (96,16 – 99,94)	94,69 % (91,68 -97,70)	96,41 % (94,68 – 98,14)	95,08 % (92,28 – 97,88)	97,89 % (95,85 – 99,93)	18,48 (10,88 – 31,37)	0,02 (0,01 -0,05)
T. cruzi Ab®	Diagnostic Bioprobes Ag recombinantes	95,70 % (93,02 – 98,38)	97,14 % (94,85 – 99,43)	96,41 % (94,68 -98,14)	97,22 % (94,99 – 99,45)	95,58 % (92,83 – 98,34)	33,50 (16,13 – 69,55)	0,04 (0,02 – 0,08)
UMELISA Chagas®	Tecnosuma Internacional Ag péptidos sintéticos	92,58 % (89,17 – 95,98)	97,55 % (95,41 – 99,69)	95,01 % (93,00 – 97,02)	97,53 % (95,37 – 99,69)	92,64 % (89,25. 96,02)	37,80 (17,14 – 83,38)	0,08 (0,05 – 0,12)

Ag: Antígeno; VPP: Valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; LR+: Positive Likelihood ratio/razón de verosimilitud positiva; LR-: Negative Likelihood ratio/razón de verosimilitud negativa. *La prevalencia del muestreo fue de 51,10% **Los valores predictivos se calcularon con base a la prevalencia del muestreo y este valor puede cambiar de acuerdo con la prevalencia de la zona donde se utilicen las pruebas.

Se verificaron las características operativas de siete técnicas comerciales de ELISA de diferentes configuraciones antigénicas, para la detección de anticuerpos de tipo IgG anti-*T. cruzi*; se incluyeron cinco técnicas con antígenos recombinantes, una con antígenos de extractos totales y una con antígenos de péptidos sintéticos. Ver Tabla 1.

Con el fin de determinar la sensibilidad y la especificidad de los diferentes binomios constituidos por las técnicas verificadas, se realizaron análisis y predicciones de pruebas múltiples en paralelo (dos técnicas realizadas simultáneamente), a través de los cuales se evidenció que la sensibilidad en el lineamiento de diagnóstico serológico se incrementa, obteniéndose incluso con algunos de estos binomios el 100% de sensibilidad, mientras que en los análisis y predicciones en serie (una técnica seguida de la otra) por el contrario aumentan la especificidad, llegando a excluir igualmente con algunos de ellos, el 100% de pacientes sanos (1,2).

Se observó en este estudio, que los binomios constituidos por ELISA antígenos de extractos totales más ELISA de antígenos recombinantes utilizados en serie, clasifican más pacientes acertadamente que el binomio ELISA con antígenos de péptidos sintéticos más ELISA de antígenos recombinantes (1,2).

Este análisis de pruebas múltiples en serie se realizó teniendo en cuenta que al interior del laboratorio el procedimiento también debe realizarse en serie, es decir, toda muestra con resultado positivo en la primera prueba de ELISA, deberá ser procesada inmediatamente por la segunda prueba a partir de la misma muestra. Así mismo, si el procesamiento es en paralelo, deberán realizarse simultáneamente en el mismo laboratorio las dos pruebas de ELISA a partir de la misma muestra (1,2).

2. Validación secundaria y verificación del desempeño de una prueba de ELISA - 2020.

Con el objetivo de ampliar la información de las pruebas de Elisa de antígenos totales disponibles en Colombia, el INS en marco del “Fortalecimiento de la capacidad diagnóstica, de investigación y de vigilancia de enfermedades transmisibles emergentes y reemergentes en Colombia” proyecto Colciencias CT:757-13 en junio de 2020, se realizó la evaluación diagnóstica de la prueba “Chagatest ELISA lisado” de Wiener Lab® correspondiente a antígenos totales.

Se realizó un estudio analítico, de evaluación diagnóstica donde comparó el desempeño de la técnica de Elisa de antígenos totales de Chagatest ELISA lisado de Wiener Lab®, frente al desempeño diagnóstico de las técnicas que componen el algoritmo diagnóstico usado en la actualidad por el grupo de parasitología; Elisa de antígenos totales TEST ELISA CHAGAS III® GrupoBios S.A. y la Elisa de antígenos recombinantes Chagatest ELISA recombinantes v.4.0 de Wiener Lab®.

El total de muestras utilizadas para este análisis fue de 501 muestras, sueros humanos que procedían de pacientes con sospecha de enfermedad de Chagas que acudieron al LNR o a los Laboratorios Departamentales de Salud Pública (LDSP) del país. El proceso se realizó dentro de las instalaciones del LNR grupo de Parasitología del INS, siguiendo las recomendaciones del fabricante en su inserto, estándares de calidad en relación al almacenamiento de reactivos y muestras, además de la respectiva trazabilidad metrológica para cada uno de los equipos, control de calidad, monitoreo y control de las condiciones ambientales (temperatura y humedad relativa).

El valor de referencia fue otorgado por el resultado de la prueba de Elisa de antígenos totales de TEST ELISA CHAGAS III® GrupoBios S.A. y la Elisa de antígenos recombinantes Chagatest ELISA recombinantes v.4.0 de Wiener Lab®, un valor positivo en ambas pruebas otorgó un valor de referencia positivo y un valor negativo en ambas pruebas otorgó un valor de referencia negativo.

El 47,3% (237) de las muestras fue positivo, el 52,7% (264) fue negativo. No se obtuvieron resultados indeterminados. Todas las muestras fueron analizadas bajo las mismas condiciones analíticas. Se realizó una comparación con el valor de referencia, se muestra a continuación la tabla 2 de contingencia para el estudio:

Tabla 2. Tabla de contingencia de la evaluación de Elisa Lisado Wiener Lab.

		Referencia		
		Positivo	Negativo	Total
Index	Positivo	236	1	237
	Negativo	20	244	264
	Total	256	245	501

Fuente: Grupo de Parasitología. LNR – INS.

Teniendo en cuenta la tabla 2 de contingencia, se estiman las siguientes características operativas (tabla 3):

Tabla 3. Características operativas de Elisa Lisado Wiener Lab.

Nombre de test	Fabricante del test	Sensibilidad* (IC95%)	Especificidad* (IC95%)	Exactitud (IC95%)	VPP** (IC95%)	VPN** (IC95%)	LR+ (IC95%)	LR- (IC95%)
Chagatest ELISA lisado®	Wiener Lab Ag totales	92,2 % (88,0 – 95,0)	99,6 % (97,4 – 100,0)	95,8 % (93,6 – 97,3)	99,6 % (97,3 – 100,0)	92,4 % (88,4 – 95,2)	225,86 (31,93 – 1597,56)	0,08 (0,05 – 0,12)

Ag: Antígeno; VPP: Valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; LR+: Positive Likelihood ratio/razón de verosimilitud positiva; LR-: Negative Likelihood ratio/razón de verosimilitud negativa.

Fuente: Grupo de Parasitología. LNR – INS.

3. Conclusiones

La prueba de ELISA convencional de antígenos de extractos totales, mostró uno de los mejores desempeños, por tanto, corresponde a la metodología que se recomienda como primera prueba o de tamizaje para la detección de anticuerpos de tipo IgG anti – *T. cruzi*, el uso de pruebas ELISA no convencionales de antígenos recombinantes y péptidos sintéticos deberán restringirse a la confirmación del diagnóstico como prueba complementaria lo cual soporta la modificación del algoritmo de diagnóstico serológico, cumpliendo con el lineamiento de la OMS (Figura 1).

Las técnicas de ELISA debido a su naturaleza y principio permiten que la lectura final de la reacción se realice mediante un equipo automatizado, eliminando de esta manera la subjetividad y la necesidad de un entrenamiento más complejo, como lo requiere la inmunofluorescencia indirecta (IFI). El uso de la prueba de IFI debe darse en caso que haya una discrepancia entre los resultados de la ELISA convencional y la no convencional. Las técnicas de ELISA tanto convencionales como no convencionales utilizan similares requerimientos técnicos y operacionales, lo cual las hace factibles de realizar en los laboratorios de salud pública y los laboratorios de mediana complejidad.

Al hacer uso de estas metodologías (pruebas de ELISA), se deben implementar las buenas prácticas de laboratorio, intervenciones metrológicas adecuadas, participación en los programas de Evaluación Externa del Desempeño (PEED), Evaluaciones Externas Indirectas del Desempeño (EEID), evaluaciones interlaboratorio, tener en cuenta la recomendación técnica emitida por el LNR del INS, para obtener reporte de resultados con altos estándares de calidad.

El uso del algoritmo basado en pruebas de ELISA con realización en serie, permitirá a más pacientes contar con un diagnóstico oportuno, veraz y de calidad en un menor tiempo, evitando los trámites administrativos, donde aquellos pacientes que realmente necesiten un tratamiento, podrán acceder a él, evitando las posibles complicaciones de tipo cardiaco que se han documentado en nuestro país con la Enfermedad de Chagas.

Los resultados de este estudio de verificación permiten al Ministerio de Salud y Protección Social viabilizar el proceso de diagnóstico presente en la Ruta de Atención Integral en Salud de la Enfermedad de Chagas, ya que el prestador y el asegurador contarán con las herramientas técnicas suficientes y oportunas para realizar el diagnóstico inicial y su confirmación en cualquier laboratorio clínico de mediana y alta complejidad, realizando de manera adecuada y

caracterizando serológicamente a los pacientes, sin dejarlos con pruebas inconclusas o pendientes.

Los resultados obtenidos con el estuche “Chagatest ELISA lisado” de Wiener Lab®, permiten tener una alternativa para el uso de pruebas de Elisa de antígenos totales disponibles a nivel nacional, siguiendo la recomendación dada desde el 2017, donde se indica el uso de estuches de antígenos totales, como primera prueba o de tamizaje para la detección de anticuerpos de tipo IgG anti – *T. cruzi*, cumpliendo con el lineamiento de la OMS y el algoritmo de diagnóstico serológico vigente para Colombia (Figura 1).

4. Recomendación

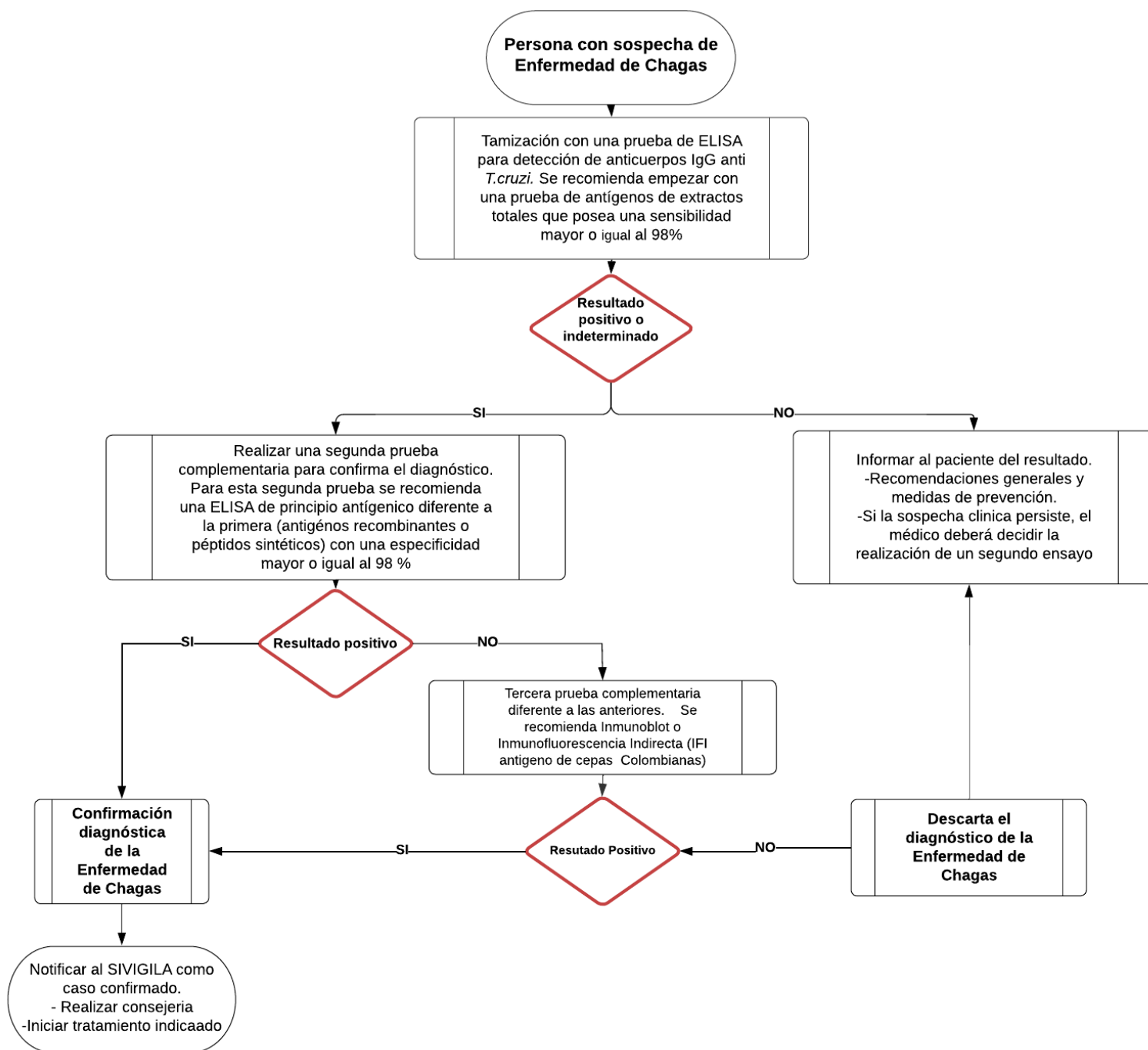
- La presente recomendación se realiza desde el LNR del INS, en relación al uso de las pruebas serológicas para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas cuyo desempeño fue verificado en términos de sensibilidad y especificidad, para mejorar la caracterización serológica de los pacientes con sospecha de esta enfermedad, a través de la modificación del lineamiento de diagnóstico serológico desde el 2017, mejorando así su acceso y oportunidad.
- Se recomienda para el diagnóstico de casos de infección crónica por *T. cruzi*, el uso de pruebas en serie de ELISA convencionales de extractos totales como primera prueba para la detección de anticuerpos de tipo IgG anti - *T. cruzi* y el uso de pruebas ELISA de antígenos recombinantes y péptidos sintéticos deberá restringirse a la confirmación del diagnóstico serológico como prueba complementaria.
- Se recomienda utilizar como primera prueba una técnica ELISA de antígenos de extractos totales con una sensibilidad mayor o igual al 98,00% y una especificidad mayor o igual al 98,00% teniendo en cuenta los intervalos de confianza del estudio. Los resultados positivos o indeterminados se deberán confirmar por medio de otro inmunoensayo de diferente principio antigénico (antígenos recombinantes o péptidos sintéticos) con sensibilidad mayor al 95,00% y especificidad mayor al 98,00%.
- En caso de discordancias entre estos dos inmunoensayos, someter la misma muestra a una tercera prueba, para lo cual se recomienda la inmunofluorescencia indirecta (IFI) o el InmunoBlot.
- En otros escenarios de utilización de estas técnicas como en bancos de sangre e intervenciones colectivas puede modificarse la aplicación de las pruebas de ELISA en serie o en paralelo del algoritmo aquí descrito, según el objetivo de uso de estas pruebas, para incrementar especificidad o incrementar sensibilidad respectivamente.

- En la fase aguda de la enfermedad de Chagas, también se pueden detectar anticuerpos mediante técnicas inmunoserológicas, los cuales pueden estar presentes dependiendo de la respuesta inmune del hospedero. En caso que la parasitemia no sea evidente mediante pruebas parasitológicas, la seroconversión de negativo a positivo entre dos pruebas con una diferencia en tiempo de tres semanas (aproximadamente 21 días) e inclusive hasta 90 días puede ser útil en el diagnóstico confirmatorio de una fase aguda.
- En la transmisión congénita si no existe parasitemia detectable por métodos parasitológicos en el recién nacido de madre seropositiva, se deben realizar estas pruebas inmunoserológicas comerciales después que el bebé cumpla los 10 meses de edad, debido a posibilidad de reacción cruzada con los anticuerpos maternos.
- Para garantizar que los resultados del diagnóstico serológico con pruebas comerciales cuenten con validez y calidad, es importante tener en cuenta buenas prácticas de laboratorio, aplicación de procedimientos de control de calidad, evaluación periódica del desempeño, la aplicación de los protocolos del fabricante y la verificación de los reactivos antes de ser utilizados por el correspondiente laboratorio. Una vez se cuente con estas condiciones, se podrá minimizar el error técnico y actividades de rutina tales como la repetición de las pruebas por resultados discrepantes en primera instancia, podrán ser evaluadas por el respectivo laboratorio.
- La prueba “Chagatest ELISA lisado” de Wiener Lab®, muestra un desempeño comparable con el algoritmo actual de diagnóstico serológico. La sensibilidad de la prueba evaluada supera el 92,5% esperado del algoritmo actual y la especificidad de la prueba evaluada supera el 93% esperado de las pruebas de referencia (tabla 3). Por tanto, se puede concluir que la prueba “Chagatest ELISA lisado” de Wiener Lab® presenta un desempeño comparable con las técnicas utilizadas en el algoritmo actual.

El LNR de Parasitología del INS, recomienda realizar el diagnóstico serológico de la Enfermedad de Chagas siguiendo el algoritmo de diagnóstico vigente a nivel nacional.

5. Algoritmo de diagnóstico serológico para la Enfermedad de Chagas

Figura 1. Algoritmo de diagnóstico serológico para la Enfermedad de Chagas



Fuente: Elaborado por autores. Grupo de Parasitología. LNR

6. Bibliografía

1. Caicedo Díaz RA, Flórez Sánchez AC. Estudio de validación de técnicas de ELISA para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas en Colombia (estudio de verificación). In Bogotá D.C.: Reunión Nacional de Laboratorios de Salud Pública (26 de septiembre); 2016.
2. Flórez Sánchez AC, Caicedo Díaz RA. Propuesta del nuevo algoritmo para el diagnóstico serológico por laboratorio de la enfermedad de Chagas. In Bogotá D.C.: Reunión Nacional de Laboratorios de Salud Pública (26 de septiembre); 2016.