



Recomendación técnica sobre el uso de métodos ELISA para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas en Colombia
- Nuevo algoritmo de diagnóstico serológico -

Instituto Nacional de Salud
Dirección de Redes en Salud Pública
Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia

Bogotá D.C., Marzo de 2017



Dirección

Martha Lucia Ospina
Director General Instituto Nacional de Salud

Coordinación

Mauricio Beltrán Durán
Director Técnico Redes en Salud Pública
Instituto Nacional de Salud

Maria Alexandra Duran Romero
Subdirectora Laboratorio Nacional de Referencia
Dirección de Redes en Salud Pública
Instituto Nacional de Salud

Martha Stella Ayala Sotelo
Coordinadora Grupo de Parasitología
Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia
Instituto Nacional de Salud

Elaborado por

Astrid Carolina Flórez Sánchez
Dirección Redes en Salud Pública
Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia
Grupo de Parasitología
Instituto Nacional de Salud

Ricardo Andres Caicedo Diaz
Dirección Redes en Salud Pública
Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia
Grupo de Parasitología
Instituto Nacional de Salud



1. Antecedentes

La Enfermedad de Chagas (ECh) es una enfermedad de interés en salud pública en Colombia, incluida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) dentro del grupo de enfermedades desatendidas, debido a su estrecha relación entre pacientes y pobreza, además del difícil acceso a saneamiento básico y su alta frecuencia en regiones marginadas del sistema de salud de los países en vía de desarrollo. Es una enfermedad zoonótica producida por la infección del parásito protozoo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) y es transmitida generalmente por contacto con heces de vectores y por otras vías como la transfusional, trasplante de órganos y oral. Los pacientes infectados pueden experimentar una fase aguda a los pocos días de la primo infección, la cual se puede caracterizar por malestar general, fiebre y en algunos casos de acuerdo a factores inmunológicos y genéticos, el paciente sin tratamiento podría pasar a un estado grave llevándolo incluso a la muerte; sin embargo, la mayoría de los pacientes pasan a fase crónica sin signos o síntomas evidentes, pero después de varios años pueden desencadenar complicaciones cardíacas y digestivas leves, moderadas o graves según condiciones fisiológicas y biológicas del parásito y del huésped (1–3).

Según estimaciones de la OMS en el año 2010, se encuentran alrededor de 5 millones de personas infectadas, distribuidas ampliamente en América Latina. Países como Bolivia, Brasil, Argentina, México, Nicaragua y Colombia hacen parte de los países con mayor carga de la enfermedad (4). En Colombia durante el año 2016 se notificaron 927 casos, 37 en fase aguda (12 confirmados y 25 probables) y 890 en fase crónica (454 confirmados y 436 probables), aunque se desconoce el porcentaje de confirmación parasitológica y la cobertura de la notificación en el Sistema de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) del país (5).

El diagnóstico de ECh se realiza de acuerdo a la sospecha de la fase de la enfermedad, para la fase aguda se utilizan métodos parasitológicos que buscan detectar directamente el parásito y para la fase crónica sintomática o asintomática, se utilizan los métodos inmunoserológicos, los cuales detectan anticuerpos que son creados frente a la infección. Existen métodos inmunoserológicos de diferentes disposiciones técnicas, así como de diferentes configuraciones antigénicas, sin embargo, una sola técnica no es suficiente para establecer un diagnóstico, de tal forma que la OMS en su informe técnico del año 2002 recomendó utilizar dos técnicas de principio diferente para aumentar la sensibilidad y especificidad del diagnóstico (1,3).

El Programa Nacional de Enfermedades Transmitidas por Vectores (ETV) y el Subprograma de Enfermedad de Chagas del Ministerio de Salud y Protección Social (MinSalud), tienen dentro de sus objetivos mejorar la cobertura, el acceso al diagnóstico y al tratamiento de esta enfermedad, ya que se han evidenciado barreras que impiden lograr un correcto y oportuno diagnóstico, manejo, tratamiento y seguimiento. De igual manera, se ha observado que durante los últimos años va en aumento la pérdida de pacientes sospechosos de la infección por *T. cruzi* (Enfermedad de Chagas) del sistema de salud, lo cual también puede estar relacionado con las pruebas de laboratorio preliminares de diagnóstico o de tamizaje que son utilizadas, las cuales requieren confirmaciones por otras metodologías que en general demandan desplazamientos de los pacientes fuera de sus sitios de residencia y trámites engorrosos con sus respectivas aseguradoras.



2. Justificación

El sistema de salud colombiano se viene modificando paulatinamente con la implementación de la Política Integral de Atención en Salud (PAIS) mediante la Resolución 429 de 2016 (6), la cual se desarrolla mediante el Modelo de Atención Integral en Salud (MAIS) y se opera por medio de las Rutas de Atención Integral en Salud (RIAS) (7). Además, una de las metas establecidas en el Plan Decenal de Salud Pública 2012 – 2021 en la sección de “*Condiciones y situaciones endemo-epidémicas*” es la reducción de la carga de la Enfermedad de Chagas mediante la disminución de la letalidad por Chagas agudo y mediante la interrupción de la transmisión de *T. cruzi* por *Rhodnius prolixus* intradomiciliado (8).

Por lo anterior, es necesario contar con evidencia suficiente a nivel técnico y científico, acerca del desempeño de las técnicas de ELISA para la detección de anticuerpos anti *T. cruzi* utilizadas para el diagnóstico de la ECh, a través de la evaluación o verificación de su uso en los diferentes escenarios, tanto a nivel de atención clínica de la enfermedad que permita un diagnóstico precoz y adecuado a nivel de los laboratorios prestadores del sistema de salud, redundando en tratamientos tempranos y precisos y en el desarrollo de intervenciones y actividades colectivas enmarcadas en salud pública, donde es imperativo contar con metodologías altamente sensibles en los procedimientos de tamización (9).

2.1. Competencias del INS (Marco legal del estudio)

Es competencia del INS realizar la validación o verificación de pruebas diagnósticas de acuerdo a lo estipulado en las siguientes normas:

- a. Decreto 2323 del 12 de Julio de 2006, Artículo 9, Numeral 8 que indica “*Realizar la validación de reactivos, pruebas diagnósticas y de técnicas y procedimientos analíticos, acorde con sus competencias y según la normatividad vigente*” (10).
- b. Resolución 429 del 17 de Febrero de 2016, por medio de la cual se adopta la Política de Atención Integral en Salud (PAIS), y en su Artículo 3°.- *Modelo Integral de Atención en Salud- MIAS*, la PAIS establece un modelo operacional que, “*a partir de las estrategias definidas, adopta herramientas para garantizar la oportunidad, continuidad, integralidad, aceptabilidad y calidad en la atención en salud de la población, bajo condiciones de equidad y comprende el conjunto de procesos de priorización, intervención y arreglos institucionales que direccionan de manera coordinada las acciones de cada uno de los integrantes del sistema, en una visión centrada en las personas. La implementación del modelo de atención exige poner a disposición de los integrantes un conjunto de herramientas (políticas, planes, proyectos, normas, guías, lineamientos, protocolos, instrumentos, metodologías, documentos técnicos) que integran los objetivos del Sistema de Salud con los del SGSSS, orientan la respuesta del Sistema y alinean su regulación*” (6).



3. Descripción del estudio y metodología

Con base en lo anterior, 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 de Parasitología (LNRP), el cual tiene disponible la infraestructura, equipos, insumos, personal idóneo y suficiente. 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).

3.1. 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.

3.2. Procesamiento analítico

En las instalaciones del LNR 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 a trazabilidad de equipos, reactivos y muestras, además de los respectivos procedimientos de calibración, control de calidad, mantenimiento y trazabilidad metrológica de condiciones ambientales (temperatura y humedad relativa).



3.3. Recolección y procesamiento de datos

Posterior al procesamiento de las muestras se obtuvieron resultados, los cuales 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).

4. Resultados

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.

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 a 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 (11,12).

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 (11,12).

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 (11,12).

5. Conclusiones

La prueba de ELISA convencional de antígenos de extractos totales mostró uno de los mejores desempeños en este estudio, 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*, cumpliendo con el lineamiento de la OMS y 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 (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 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.

La utilización de estas metodologías debe realizarse teniendo en cuenta las buenas prácticas de laboratorio, intervenciones metrológicas adecuadas, participación en los programas de evaluación externa del desempeño y tener en cuenta para su uso esta recomendación técnica emitida por el LNR del INS. El uso de este nuevo 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 que anteriormente existían y aquellos pacientes que realmente necesitan un tratamiento, podrán acceder a él y así podrán evitar las posibles complicaciones de tipo cardíaco que principalmente 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



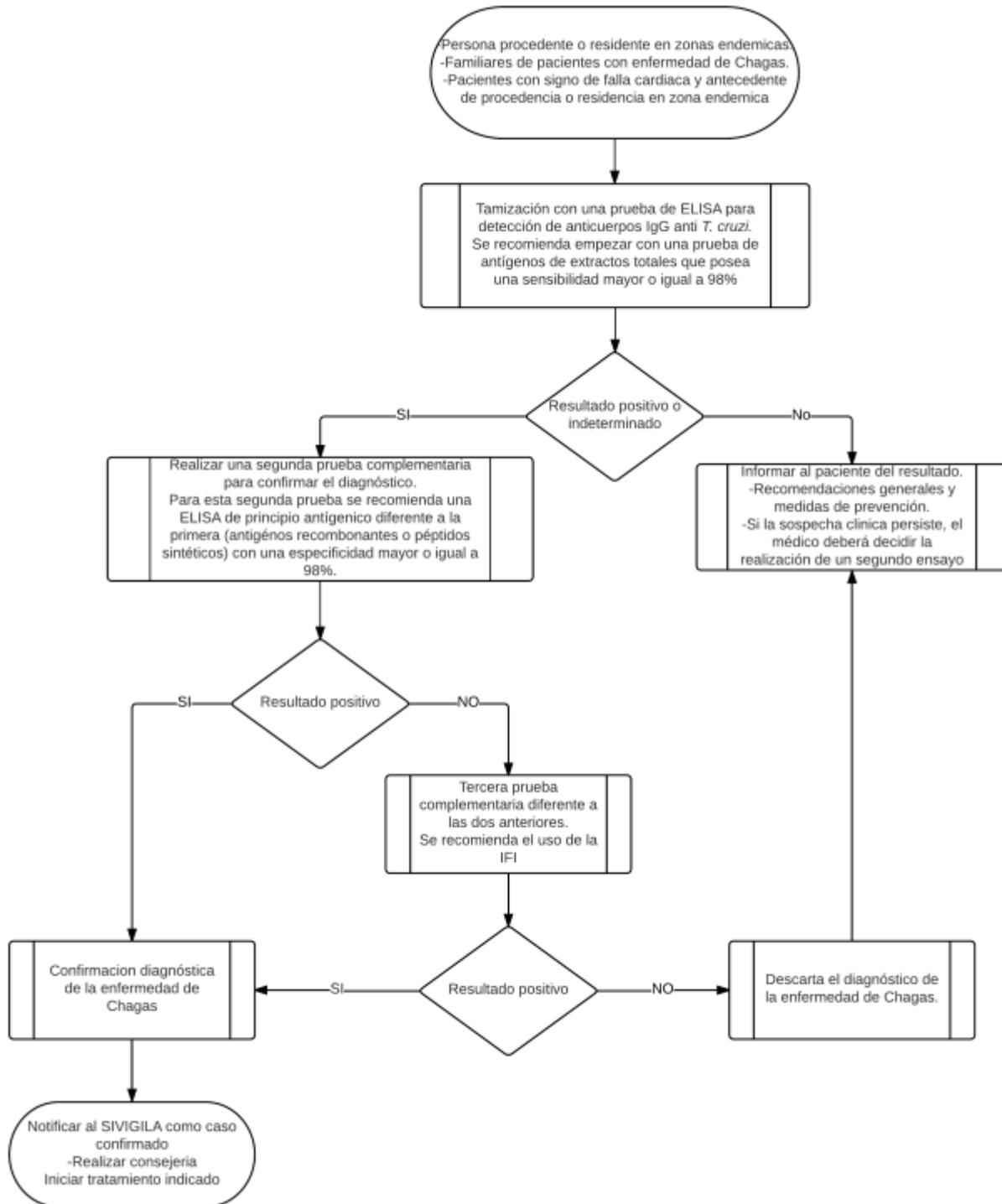
Enfermedad de Chagas, ya que el prestador y el asegurador contarán con las herramientas técnicas suficientes y oportunas para realizar el diagnóstico inicial y su confirmación en cualquier laboratorio clínico de mediana y alta complejidad y así realizar estas pruebas y caracterizar serológicamente los pacientes de manera adecuada, sin dejarlos con pruebas inconclusas o pendientes.

6. 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 este estudio 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 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 o de tamizaje 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 o de tamizaje 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, una vez esta última haya sido evaluada por el LNR de Parasitología.
- 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 a partir de 25 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 de cumplir 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.

Con base a estos resultados obtenidos, el LNR de Parasitología del INS, a partir de la fecha recomienda realizar el diagnóstico serológico de la Enfermedad de Chagas de la siguiente manera:

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





7. Referencias

1. WHO. Chagas Diseases Control. Publicacion 905. WHO Scientific; 2002. p. 109.
2. Molina I, Salvador F, Sánchez-Montalvá A. Actualización en enfermedad de Chagas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2016;34(2):132–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2015.12.008>
3. Silveira CA, Abad Franch F, Schmunich GA, Luquetti AO. Programa Regional para el Control de la Enfermedad de Chagas en America Latina. Iniciativa de bienes publicos regionales. BID/OPS/IDRC/CNZ. Montevideo, Uruguay; 2010. 242 p.
4. Donadeu M, Lightowlers MW, Fahrion AS, Kessels J, Abela-Ridder B. *Weekly epidemiological record*. 2009;III(47):445–52. Available from: <http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=KARDEX.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=003687>
5. Instituto Nacional de Salud. Boletín Epidemiológico Semana 52 - 2016. 2016.
6. Presidencia de la Republica. Ministerio de Salud y Protección Social. Resolución 429 de 2016.
7. Presidencia de la Republica. Ministerio de Salud y Protección Social. Resolución 3202 de 2016.
8. Presidencia de la Republica. Ministerio de Salud y Protección Social. Plan Decenal de Salud Pública 2012-2021.
9. Presidencia de la República, MinSalud. Resolución 0518 de 2015.
10. Presidencia de la República. Ministerio de Salud y Protección Social. Decreto 2323 de 2006.
11. Caicedo Díaz RA, Florez Sanchez 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.: Reunion Nacional de Laboratorios de Salud Pública (26 de Septiembre); 2016.
12. Floréz Sanchez AC, Caicedo Diaz RA. Propuesta del nuevo algoritmo para el diagnóstico serológico por laboratorio de la enfermedad de Chagas. In Bogotá D.C.: Reunion Nacional de Laboratorios de Salud Pública (26 de Septiembre); 2016.