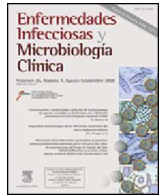


Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

Comparación entre técnicas inmunológicas y moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas

Elizabeth Ferrer^{a,b,*}, María Lares^a, Mercedes Vietri^a y Mehudy Medina^c

^a Instituto de Investigaciones Biomédicas Dr. Francisco J. Triana Alonso (BIOMED), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo Sede Aragua, Maracay, Venezuela

^b Departamento de Parasitología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo Sede Aragua, Maracay, Venezuela

^c Laboratorio de Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas, Dirección General de Salud Ambiental, Ministerio del Poder Popular para la Salud, Maracay, Venezuela

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 8 de junio de 2012

Aceptado el 2 de septiembre de 2012

On-line el 25 de octubre de 2012

Palabras clave:

Enfermedad de Chagas

Diagnóstico

Reacción en cadena de la polimerasa

Inmunoensayo enzimático

Hemaglutinación indirecta

Inmunofluorescencia indirecta

R E S U M E N

Introducción: La enfermedad de Chagas es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*. Esta enfermedad comprende una fase aguda y una crónica. El diagnóstico presenta limitaciones en las técnicas parasitológicas y en las inmunológicas. Las técnicas moleculares son una alternativa, pero estas deben ser evaluadas. El objetivo de este trabajo fue comparar la eficacia de las técnicas inmunológicas con la de las moleculares en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en las diferentes fases.

Métodos: Se utilizaron las pruebas inmunológicas ELISA, HAI e IFI, y como ensayos moleculares las PCR para la amplificación de ADN de minicírculo de cinetoplasto y ADN satélite de *T. cruzi*. Se evaluaron 39 muestras de sangre de pacientes en fase aguda y 42 muestras de pacientes en fase crónica de la enfermedad. Además se analizaron 20 muestras de individuos sanos y 10 de pacientes con otras enfermedades.

Resultados: Con las técnicas inmunológicas resultaron positivas el 69,2% de las muestras de pacientes en fase aguda, mientras que en la fase crónica resultaron positivas el 95,2%. Con las pruebas moleculares resultaron positivas el 79,5% de las muestras de pacientes en fase aguda, mientras que con las muestras de pacientes en fase crónica resultaron positivas el 23,8%. Ninguna de las muestras de los individuos sanos resultó positiva por ninguna técnica, mientras que en las pruebas inmunológicas 2 muestras de pacientes con otras enfermedades resultaron positivas.

Conclusión: La eficacia diagnóstica de las técnicas moleculares es elevada en la fase aguda, mientras que en la fase crónica son más eficaces los ensayos inmunológicos.

© 2012 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Comparison between immunological and molecular techniques for the diagnosis of Chagas disease

A B S T R A C T

Keywords:

Chagas disease

Diagnosis

Polimerase Chain Reaction

Enzyme-linked immunosorbent assay

Indirect hemagglutination

Indirect immunofluorescence

Introduction: Chagas disease is caused by the parasite *Trypanosoma cruzi*. The disease involves an acute and chronic phases. The diagnosis has limitations, both in parasitological and immunological techniques. Molecular assays are an alternative, but these must be evaluated to determine its diagnostic usefulness. The aim of this study was to compare the effectiveness of immunological techniques with molecular assays in the diagnosis of Chagas disease in its different phases.

Methods: The immunological techniques used were ELISA, HAI and IFI and the molecular techniques used were PCR for amplification of kinetoplast minicircles, and satellite DNA of *T. cruzi*. Thirty-nine blood samples from patients in the acute phase of Chagas disease, and 42 samples from patients in the chronic phase were evaluated. In addition, 20 samples from healthy individuals and 10 patients with other diseases were also studied.

Results: With immunological techniques were positive, 69.2% of samples from patients in the acute phase, while in the chronic phase were positive 95.2%. Using molecular techniques 79.5% of samples from patients in the acute phase were positive, while 23.8% of the samples from patients in the chronic phase were positive. None of the samples from healthy individuals was positive for any technique, while two samples from patients with other diseases were positive by the immunological assays.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: elizabeth.ferrer@gmail.com (E. Ferrer).

Conclusions: The diagnostic efficacy of molecular techniques is high in the acute phase of Chagas disease, while in the chronic phase the immunological techniques are more effective.

© 2012 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La enfermedad de Chagas es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*. Se estima que en el continente americano existen 10 millones de personas infectadas, y que 25 millones están en situación de riesgo de contraer la enfermedad^{1,2}. Esta enfermedad comprende una fase aguda corta, caracterizada por una abundante parasitemia seguida de una recuperación completa o de la instauración de la fase crónica de la enfermedad, con una parasitemia escasa y un curso clínico impredecible, que va desde la ausencia de síntomas hasta una enfermedad grave con compromiso cardiovascular y/o gastrointestinal que puede ocasionar la muerte³.

En Venezuela, actualmente existe un repunte de la enfermedad de Chagas. Los recientes focos y brotes agudos por transmisión oral en la región capital⁴ y en el estado Vargas⁵, así como el reporte de casos agudos en los diferentes estados del país^{6–10} y el aumento de seropositivos en bancos de sangre¹¹, indican el resurgimiento de la enfermedad en el país. La migración humana de otras áreas endémicas llevando reservorios domésticos y vectores infectados con *T. cruzi*, la urbanización desorganizada, la deforestación y la irrupción en ciclos silvestres son elementos de riesgo que explicarían la emergencia y re-emergencia de la enfermedad de Chagas en Venezuela^{6,7,9,12}.

En general, el diagnóstico de la enfermedad se basa en los signos y síntomas clínicos, los datos epidemiológicos y los resultados de laboratorio, incluyendo pruebas parasitológicas, inmunológicas y moleculares. En relación con el diagnóstico inmunológico existe consenso en recomendar al menos 2 técnicas con la finalidad de tener un alto grado de confiabilidad, sugiriéndose una tercera prueba en caso de discrepancia entre ellas¹³. Las técnicas más comúnmente utilizadas incluyen hemaglutinación indirecta (HAI), inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ensayos inmunoenzimáticos (ELISA). Aunado a estas técnicas, se han desarrollado herramientas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual ha contribuido a la obtención de un cribado más certero de la enfermedad^{14,15}. En Venezuela el inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas se realiza comúnmente en centros públicos y privados y principalmente se utilizan pruebas comerciales de varios laboratorios nacionales y extranjeros. En este aspecto, algunos investigadores han informado sobre resultados inconsistentes registrados en pacientes diagnosticados en estos centros cuando se comparan con los obtenidos en laboratorios especializados en el estudio de la enfermedad de Chagas¹¹.

Entre los protocolos más utilizados para el diagnóstico molecular de la enfermedad de Chagas se encuentran la PCR para la detección de ADN satélite de *T. cruzi*^{16,17} y la PCR para la detección de ADN de las regiones variables de los minicírculos del cinetoplasto de *T. cruzi*^{18,19}. Ambas técnicas se han aplicado en muestras de pacientes, reservorios y vectores y han sido estandarizadas y validadas en nuestro laboratorio^{20,21}. Sin embargo, muchas veces no ha sido posible la confirmación por PCR de casos clínicos de Chagas y se han reportado valores de sensibilidad y especificidad muy diferentes en los distintos países^{17–19}.

En Venezuela, las técnicas moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas solo se utilizan en laboratorios de investigación, y en líneas generales no se conoce su eficacia diagnóstica, ya que no se ha realizado una valoración con respecto a las pruebas inmunológicas convencionalmente utilizadas. El propósito del siguiente trabajo fue comparar la eficacia diagnóstica de las técnicas inmunológicas con la de las moleculares en las diferentes fases de la enfermedad de Chagas.

Métodos

Muestra biológica

Se evaluaron 39 muestras de sangre y suero de pacientes con enfermedad de Chagas en fase aguda, y 42 muestras de pacientes en fase crónica de la enfermedad, provenientes de diferentes zonas de Venezuela, confirmados previamente mediante diagnóstico clínico (realizado por cardiólogos especializados con experiencia en enfermedad de Chagas), inmunodiagnóstico (ELISA, HAI, IFI) y/o métodos parasitológicos (extendido de sangre coloreado, xenodiagnóstico y hemocultivo) (controles positivos). Además de 20 muestras de individuos sanos, las cuales fueron negativas a las técnicas inmunológicas convencionales y pertenecientes a donantes sin síntomas ni historia de contacto con la parasitosis en estudio (controles negativos) y 10 de pacientes con otras enfermedades relacionadas (leishmaniasis visceral y cutánea, toxoplasmosis, malaria). El protocolo de trabajo fue aprobado por el Comité de Bioética del BIOMED-UC.

Cultivo de parásitos

Los parásitos *T. cruzi* TcDm28c²² se cultivaron in vitro en medio LIT (*liver-infusion-tryptose*) con suero fetal bovino (Internegocios S.A., Buenos Aires, Argentina) al 10%.

Preparación del antígeno de Maeckelt

Previamente se preparó el antígeno de Maeckelt de *T. cruzi*, a partir de los cultivos del parásito, los cuales se centrifugaron y se sometieron a 3 procesos de congelación-descongelación. Se hizo la deslipidación con benceno y se almacenó hasta su uso²³.

Hemaglutinación indirecta

Se trataron glóbulos rojos de carnero con ácido tánico y se sensibilizaron con el antígeno de Maeckelt de *T. cruzi*. La prueba se hizo en placa haciendo diluciones del suero del paciente con tampón fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés *phosphate buffered saline*) (1/25, 1/50 y 1/100). Se incubó a temperatura ambiente de 2–3 h y se observó la formación de hemaglutinación²⁴.

Inmunofluorescencia indirecta

En láminas para inmunofluorescencia se fijaron epimastigotas de *T. cruzi* y se dejaron secar. Posteriormente se colocaron los sueros (diluidos 1/50), se incubó a 37 °C durante una hora, se lavó con PBS-Tween 20 y se le agregó anti-IgG humana marcada con fluoresceína (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.), se incubó durante 1 h a 37 °C en cámara húmeda y se observó al microscopio de fluorescencia²⁵.

Inmunoensayo enzimático

Se sensibilizaron placas con el antígeno de Maeckelt de *T. cruzi* y se bloquearon con BSA (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) al 1% en PBS. Posteriormente se colocaron 100 µl de cada suero (diluido 1/50) y se mantuvo 1 h a 37 °C. Luego se añadieron 100 µl de conjugado anti-IgG humana acoplado a peroxidasa (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Rockford IL, EE.UU.) y se incubó a 37 °C durante 1 h. Después se lavaron las placas. Se añadieron 100 µl de sustrato ácido 2,2'-azobis(3-etil-benzotiazol-6-sulfónico) (ABTS) (Sigma, St. Louis, MO,

EE. UU.). Se incubó a 37 °C durante 20 min y se midió la densidad óptica a 405 nm en un lector de ELISA (Dynatech MR5000, HiTech Trader, Mount Holly, NJ, EE. UU.)²⁶.

Puntos de corte

Se tomaron como puntos de corte los ya establecidos previamente en el laboratorio²⁷: en el caso de HAI e IFI, la presencia de hemaglutinación y fluorescencia, respectivamente, a la dilución 1/50, y para ELISA lecturas superiores a 0,320 de densidad óptica (DO_{405 nm}) a la dilución 1/50.

Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN a partir de las muestras de sangre descritas anteriormente, utilizando la resina Chelex® 100 (BioRad, Hercules CA, EE.UU.). Se colocaron en un microtubo 200 µl de sangre, se añadió agua destilada y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente, luego se centrifugó y se retiró el sobrenadante dejando 50 µl, al cual se le añadieron 200 µl de Chelex® 100 (BioRad, Hercules, CA, EE. UU.) al 5% y se incubó a 56 °C durante 30 min. Posteriormente se agitó durante 10 s, se incubó a 100 °C durante 10 min, se centrifugó durante 3 min y se recogió el sobrenadante que contenía el ADN²⁰.

Técnica de reacción en cadena de la polimerasa para la detección de ADN de minicírculo de kinetoplasto de *T. cruzi*

Para la detección de ADN de minicírculo de cinetoplasto de *T. cruzi* se utilizó el protocolo de Wincker et al.¹⁹, que amplifica una banda de 330 pares de bases (pb) empleando los cebadores 121 5'-AAATAATGTACGGGTGAGATGCATGA-3' y 122 5'-GGGTTTCGATTGGGGTTGGTGT-3'. Dicho protocolo fue modificado para adaptarlo a las condiciones del laboratorio²⁰. Las condiciones de reacción fueron: desoxinucleótidos tri-fosfato (dNTP) (Promega, Madison, EE. UU.) 200 µM, cebadores 0,5 µM, cloruro de magnesio 2 mM y *Taq* polimerasa (Promega, Madison, EE. UU.) 1U. La PCR se llevó a cabo mediante el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94 °C durante 10 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, hibridación a 63 °C por 30 s y extensión a 72 °C durante 30 s, terminando con una extensión final a 72 °C durante 10 min.

Técnica de reacción en cadena de la polimerasa para la detección de ADN satélite de *T. cruzi*

Se realizó la prueba de PCR para la detección de ADN satélite de *T. cruzi* según el protocolo descrito por Moser et al.¹⁶, empleando los cebadores específicos: TcZ1 (cebador directo) 5'-CGAGCTCTTGGCCACACGGGTGCT-3' y TcZ2 (cebador reverso) 5'-CCTCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3'. Estos cebadores permiten la amplificación de una región repetida de 188 pb del ADN satélite de *T. cruzi*. Las reacciones de amplificación se realizaron según el protocolo descrito, con modificaciones para adaptarlo a las condiciones del laboratorio²⁰. Las condiciones de reacción fueron: desoxinucleótidos tri-fosfato (dNTP) (Promega, Madison, EE. UU.) 200 µM, cebadores 0,5 µM, cloruro de magnesio 2 mM y *Taq* polimerasa (Promega, Madison, EE. UU.) 1U. La PCR se llevó a cabo mediante el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94 °C durante 10 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, hibridación a 55 °C durante 30 s y extensión a 72 °C durante 30 s, terminando con una extensión final a 72 °C durante 10 min.

Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La electroforesis se realizó en geles de agarosa al 1%, utilizando como tampón TAE (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8) y un sistema de electroforesis horizontal Minicell® (Thermo Scientific, Asheville, NC, EE. UU.). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0,5 g/ml). Las bandas de ADN se visualizaron con luz ultravioleta mediante el sistema Gel Doc 1000® de BioRad (Hercules, CA, EE. UU.).

Análisis de resultados

Se compararon los resultados obtenidos con las pruebas inmunológicas y los obtenidos con las técnicas moleculares, en las diferentes muestras de los grupos de individuos y en las diferentes fases de la enfermedad. Los resultados se ordenaron en una tabla de contingencia 2 × 2 y se calcularon los índices diagnósticos: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN). Se determinó el índice de kappa de Cohen's calculado mediante el programa Stat Xact 8.0 para Windows, para evaluar la concordancia entre los resultados.

Resultados

Las técnicas de ELISA e IFI fueron las que mostraron mayor cantidad de positivos, tanto en la fase aguda como en la crónica (tabla 1). Por otro lado, estas 2 pruebas fueron las que presentaron 2 falsos positivos, que correspondieron a individuos con leishmaniasis visceral. La sensibilidad de las pruebas inmunológicas en fase aguda fue menor que en la fase crónica.

La mayoría de las muestras de pacientes en fase aguda de la enfermedad dieron positivo por PCR-ADN kinetoplasto y PCR-ADN satélite, mientras que en la fase crónica muy pocas muestras dieron resultados positivos (tabla 2). Aunque se observa una pequeña diferencia en los resultados de estas PCR, de hecho esta no fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Todos los individuos diagnosticados previamente como de otras enfermedades relacionadas, así como los individuos sanos, resultaron negativos en las 2 PCR (tabla 2). Por otro lado, se observó muy buena concordancia entre las 2 PCR evaluadas tanto con las muestras de la fase aguda como con las muestras de fase crónica, al obtenerse índices kappa de 0,94 y 0,89, respectivamente (IC95%).

Al comparar los índices diagnósticos de las pruebas inmunológicas con los obtenidos con las técnicas moleculares se observa una mayor sensibilidad con las PCR en las muestras de pacientes en la fase aguda de la enfermedad. En cuanto a las técnicas inmunológicas, en la fase crónica se observó la mayor sensibilidad. La especificidad de las técnicas moleculares fue del 100%, mientras que en las técnicas inmunológicas 2 de los individuos con otras enfermedades resultaron positivos, por lo que la especificidad fue del 93,3% (tabla 3). En cuanto a los VPP y VPN, en la fase aguda de la enfermedad fueron mayores para las técnicas moleculares, mientras que en la fase crónica fueron mayores en las técnicas inmunológicas (tabla 3). El índice kappa de 0,66 (IC 95%) señala una buena concordancia entre los resultados de las técnicas inmunológicas y moleculares en la fase aguda de la enfermedad. En la fase crónica se obtuvo un índice kappa de 0,40 (IC95%), indicando que no hubo concordancia.

Discusión

En Venezuela, actualmente existe un repunte de la enfermedad de Chagas, evidenciado por los recientes focos y brotes agudos por transmisión oral^{4,5}, el reporte de casos agudos en los diferentes estados del país^{6-10,12} y el aumento de seropositivos en bancos

Tabla 1

Detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* mediante ELISA, HAI e IFI en muestras de pacientes con enfermedad de Chagas en fase aguda y crónica, pacientes con otras enfermedades relacionadas (heterólogos) e individuos sanos

Muestras	Técnicas			
	ELISA Positivos ^b	HAI Positivos ^b	IFI Positivos ^b	Diagnóstico definitivo ^a Positivos ^b
Positivos fase aguda	27/39 (69,2)	25/39 (64,1)	27/39 (69,2)	27/39 (69,2)
Positivos fase crónica	40/42 (95,2)	37/42 (88,1)	40/42 (95,2)	40/42 (95,2)
Heterólogos	2/10 (20)	0/10 (0)	2/10 (20)	2/10 (20)
Negativos	0/20 (0)	0/20 (0)	0/20 (0)	0/20 (0)

^a Según criterios de la OMS (2 positivos de las 3 realizadas).

^b Muestras positivas/muestras analizadas (%).

Tabla 2

Detección de ADN de *Trypanosoma cruzi* mediante PCR-ADNk y PCR-ADNsat en muestras de pacientes con enfermedad de Chagas en fase aguda y crónica, pacientes con otras enfermedades relacionadas (heterólogos) e individuos sanos

Muestras	Técnicas		
	PCR-ADNk Positivos ^b	PCR-ADNsat Positivos ^b	Diagnóstico definitivo ^a Positivos ^b
Pacientes en fase aguda	30/39 (76,9)	31/39 (79,5)	31/39 (79,5)
Pacientes en fase crónica	10/42 (23,8)	11/42 (26,2)	11/42 (26,2)
Heterólogos	0/10 (0)	0/10 (0)	0/10 (0)
Individuos sanos	0/20 (0)	0/20 (0)	0/20 (0)

ADNk: ADN de minicirculo de kinetoplasto; ADNsat: ADN satélite.

^a Una de las PCR positiva de las 2 realizadas.

^b Muestras positivas/muestras analizadas (%).

de sangre¹¹. La discrepancia entre los resultados obtenidos en los diferentes centros de diagnóstico y los de los laboratorios especializados en el estudio de la enfermedad de Chagas en Venezuela¹¹ señala la necesidad del análisis y de la comparación de la eficacia de las diferentes técnicas empleadas en diagnóstico.

Debido a los problemas comunes de sensibilidad y especificidad de los ensayos inmunológicos, para la confirmación de un caso agudo la OMS recomienda el uso de pruebas parasitológicas; para el cribado serológico se recomienda una prueba de sensibilidad elevada, y para el diagnóstico, el uso de al menos 2 pruebas de antígenos y principios distintos. Se recomienda el uso de una tercera técnica ante casos de discrepancia^{1,2,13}.

En el presente trabajo, las técnicas inmunológicas que mostraron mayor cantidad de positivos, tanto en la fase aguda como en la crónica, fueron ELISA e IFI. Por otro lado, estas 2 pruebas fueron las que presentaron 2 falsos positivos, que correspondieron a individuos con leishmaniasis visceral. La técnica de HAI suele presentar menor sensibilidad que ELISA e IFI, como ha sido reportado por otros autores^{28,29}; sin embargo, es una técnica económica y sencilla, ampliamente utilizada en Venezuela y que, junto con otras pruebas, es útil para la obtención de 2 pruebas coincidentes, como en este caso.

La sensibilidad de las pruebas inmunológicas en la fase aguda fue menor que en la fase crónica; esto puede deberse a que en la fase aguda temprana todavía no haya suficiente cantidad de anticuerpos para ser detectados por estas técnicas. Por otro lado, se ha reportado en la enfermedad de Chagas un porcentaje pequeño de individuos llamados «no respondedores», los cuales, a pesar de estar

infectados, nunca desarrollan una respuesta de anticuerpos detectable³⁰. En cuanto a la fase crónica, la sensibilidad de las pruebas inmunológicas fue elevada, como se ha descrito en varios estudios^{28,31}; solo 2 pacientes dieron negativo, lo cual puede deberse a que eran pacientes crónicos de larga duración, en los cuales el título de anticuerpos podría haber disminuido con el tiempo.

La mayoría de las muestras de pacientes en fase aguda de la enfermedad dieron positivo por PCR-ADN de kinetoplasto y PCR-ADN satélite, observándose pequeñas diferencias en los resultados de estas técnicas, que no fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Por otro lado, estas 2 PCR mostraron buena concordancia. Sin embargo, en otro trabajo se han reportado diferencias significativas con el uso de las PCR evaluadas²¹. Estas diferencias en sensibilidad podrían deberse a la variabilidad genética de los diferentes aislados parasitarios, ya que el número de copias de las repeticiones de las secuencias que se amplifican en las PCR varía dependiendo del aislado parasitario^{32,33}, lo que genera variaciones en la sensibilidad del ensayo.

La mayor sensibilidad de las técnicas de PCR observada en muestras de pacientes de fase aguda era de esperar, ya que es la fase donde existe mayor parasitemia y, por lo tanto, se puede detectar el ADN parasitario. En la fase crónica, debido a la escasez de parásitos circulantes —ya que estos están confinados a tejidos—, las pruebas de PCR presentan menor sensibilidad¹⁸. Sin embargo, es importante resaltar que en la sensibilidad de la PCR influyen también el método de extracción de ADN y el volumen de sangre que se emplea para la extracción de ADN³⁴. En el presente trabajo, el uso de una técnica de extracción de

Tabla 3

Comparación de los índices diagnósticos de las pruebas inmunológicas con los de las técnicas moleculares en las 2 fases de la enfermedad

	Técnicas inmunológicas		PCR	
	Fase aguda	Fase crónica	Fase aguda	Fase crónica
Sensibilidad	69,2%	95,2%	79,5%	26,2%
Especificidad	93,3%	93,3%	100%	100%
Valor predictivo positivo	93,1%	95,2%	100%	100%
Valor predictivo negativo	70%	93,3%	77,8%	49,2%

IC 95%.

ADN rápida y que utiliza poco volumen de muestra pudo haber influido en la obtención de una sensibilidad muy baja (especialmente en la fase crónica) con respecto a la reportada por otros autores^{34–38}. Así, se recomienda el uso de otras técnicas de extracción de ADN, principalmente para el diagnóstico en la fase crónica, donde estas técnicas de PCR han demostrado la presencia de ADN del parásito en muestras en las cuales no hay una parasitemia detectable, por lo que se han recomendado como ensayos complementarios para utilizar en conjunto con las técnicas inmunológicas^{17,18,31}.

Todos los índices diagnósticos obtenidos con las técnicas moleculares fueron mayores que los de las pruebas inmunológicas en las muestras de pacientes en la fase aguda de la enfermedad. Resultados similares han sido reportados por otros investigadores y se corresponden con la dinámica de la enfermedad en sus diferentes fases, donde al principio existen parásitos circulantes en sangre, por lo que se puede detectar su ADN debido a la elevada sensibilidad de la PCR, aun cuando la parasitemia sea muy baja y las técnicas parasitológicas no la detecten^{14–19,21,31}. En la fase crónica la mayoría de los parásitos se encuentran confinados en tejidos por lo que habrá poco ADN circulante, mientras que la respuesta de anticuerpos será mayoritaria^{31,39}.

Existen varios trabajos que tratan de comparar técnicas inmunológicas con ensayos moleculares y que encuentran variabilidad al hacer pruebas de concordancia entre estas técnicas. Esta variabilidad se debe a que son pruebas de distinta naturaleza y detectan cosas diferentes, donde no necesariamente se encuentra concordancia^{19,31,40}. La presencia de ADN parasitario en la muestra no siempre va acompañada de anticuerpos detectables, sino que existe una dinámica entre estos elementos que tiene que ver con las fases de la enfermedad y el tiempo de infección. Así, para hacer comparaciones sería aconsejable determinar los índices diagnósticos para cada fase de la enfermedad y, basándose en ellos, comparar la eficacia diagnóstica de cada prueba para cada fase, como ha sido realizado en algunos trabajos^{18,39}.

La especificidad de las técnicas moleculares fue del 100%, mientras que por las técnicas inmunológicas la especificidad fue menor, como se ha descrito en numerosos trabajos^{16–19,21,31,36,39}.

Las técnicas de PCR, como toda técnica, tienen sus limitaciones, y son menos sensibles en la fase crónica de la enfermedad. Por otra parte, su coste y su poca disponibilidad en los diferentes centros de diagnóstico de Venezuela hacen que actualmente no puedan usarse en todos los casos. Sin embargo, es una prueba que ofrece muchas ventajas en los casos en los que la parasitemia es baja, bien sea por estar en fase crónica o por infecciones que cursan con bajas parasitemias. Además, ayuda al diagnóstico de la enfermedad en pacientes inmunocomprometidos, en los cuales la producción de anticuerpos es deficiente y permite el seguimiento a los pacientes en tratamiento, donde los métodos inmunológicos no son adecuados^{17,40}. Otra ventaja es el diagnóstico de Chagas congénito en recién nacidos, para el que las pruebas de PCR han demostrado alta sensibilidad^{14,34,41}.

Todos los trabajos mencionados y el presente señalan la utilidad de los métodos moleculares en la fase aguda de la enfermedad y los métodos inmunológicos en la fase crónica de la enfermedad, aunque lo más recomendable, para garantizar un diagnóstico certero, es combinar el uso de las técnicas parasitológicas, inmunológicas y moleculares de acuerdo con la fase de la enfermedad que se sospecha.

Financiación

Ayuda Menor CDCH-UC 0440-10, Universidad de Carabobo, y Ayuda Menor CDCH-UC-0450-10, Universidad de Carabobo.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- WHO. Chagas Disease (American Trypanosomiasis). Fact Sheet N° 340. 2010 [documento en línea] [consultado Ago 2012]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>
- WHO. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO report on neglected tropical diseases. 2010 [documento en línea] [consultado Ago 2012]. Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090_eng.pdf
- Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis.* 2001;1:92–100.
- Alarcón de Noya B, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Zavala-Jaspe R. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *J Infect Dis.* 2010;201:1308–15.
- Noticias Epidemiológicas. Enfermedad de Chagas a 100 años de su descripción y descubrimiento del *Trypanosoma cruzi*. Red de Sociedades Científicas Médicas de Venezuela. 2009; 2:1–8 [documento en línea] [consultado Ago 2012]. Disponible en: <http://ovsalud.org/doc/Notiepi2.pdf>
- Añez N, Carrasco H, Parada H, Crisante G, Rojas A, González N, et al. Acute Chaga's disease in Western Venezuela, a clinical, ecoparasitological and epidemiological study. *Am J Trop Hyg.* 1999;60:215–22.
- Añez N, Crisante G, Rojas A. Update on Chagas disease in Venezuela —a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004;99:781–7.
- Añez N, Crisante G, Parada H. Nuevos casos de enfermedad de Chagas en el Occidente de Venezuela. *Salus.* 2007;11:87–90.
- Añez N, Atencio R, Rivero Z, Bracho A, Rojas A, Romero M, et al. Detección de infecciones inaparentes de la enfermedad de Chagas en individuos asintomáticos de la etnia Yukpa del occidente de Venezuela. *Bol Mal Salud Amb.* 2011;51:59–67.
- Morocoima A, Tineo Brito EJ, Ferrer E, Herrera L, Nuñez M. Enfermedad de Chagas en el estado Anzoátegui, Venezuela: Registro de un caso agudo y caracterización parasitológica y molecular del aislado. *Bol Malar Salud Amb.* 2008;48:147–52.
- Díaz Bello Z, Zavala-Jaspe R, Díaz-Villalobos M, Mauriello L, Maekelt A, Alarcón de Noya B. Diagnóstico confirmatorio de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* en donantes referidos por bancos de sangre en Venezuela. *Invest Clin.* 2008;49:141–50.
- Díaz-Suárez O. Chagas disease: re-emergent or neglected. *Invest Clin.* 2009;50:415–8.
- Organización Mundial de la Salud. Control de la Enfermedad de Chagas. Segundo Informe del Comité de Expertos de la OMS. 2002. Serie de Informes Técnicos 905. Ginebra: 2002.
- Virreira M, Torrico F, Truysens C, Alonso-Vega C, Solano M, Carlier Y, et al. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;68:574–82.
- Portela-Lindoso A, Shikanai-Yasuda MA. Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction. *Rev Saude Publica.* 2003;37:107–15.
- Moser D, Kirchhoff L, Donelson J. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1989;27:1477–82.
- Russomando G, Figueredo A, Almiron M, Sakamoto M, Morita K. Polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum. *J Clin Microbiol.* 1992;30:2864–8.
- Ávila H, Pereira J, Thiemman O, de Paiva E, Degraive W, Morel C, et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic Chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: Comparison with serology and xenodiagnosis. *J Clin Microbiol.* 1993;31:2421–6.
- Wincker P, Bosseno MF, Britto C, Yaksic N, Cardoso MA, Morel CM, et al. High correlation between Chagas disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in Bolivian children living in an endemic area. *FEMS Microbiol.* 1994;124:419–24.
- Ferrer E, Da Conceição F, Campioli P, Rivera MG, López M, Lares M, et al. Estandarización de técnicas moleculares para la identificación y caracterización de *Trypanosoma cruzi*. Memorias del VI Congreso de Investigación en la Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela. 2008;532–6.
- Ferrer E, Da Conceição F, Campioli P, Lares M, López M, Rivera MG, et al. Validación de protocolos de PCR para el diagnóstico molecular de la enfermedad de Chagas. *Salus.* 2009;12:163–74.
- Contreras V, Salles J, Thomas N, Morel C, Goldenberg S. *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol Biochem Parasitol.* 1985;16:123–33.
- Maekelt A. Diagnóstico de laboratorio de la tripanosomiasis americana. *Rev Venez Sanid Asist Soc.* 1964;29:1–18.
- Camargo M, Hoshino S, Correa N, Peres B. Hemagglutination test for Chagas' disease with chromium chloride formalin-treated erythrocytes, sensitized with *Trypanosoma cruzi* extract. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 1971;13:45–50.
- Camargo M. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American Trypanosomiasis technical modification employing preserved culture forms of *T. cruzi* in a slide test. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 1966;8:227–34.
- Voller A, Bidwell D, Hult G, Engvall A. Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas disease. *Lancet.* 1975;1:426–8.

27. Briceño D, Caballero G, Lares M, Viettri M, Medina M, Ferrer E. Diagnóstico inmunológico de la enfermedad de Chagas a partir de muestras colectadas en papel de filtro. *Salus*. 2012;16:42–52.
28. Cannova D, Aguilar M, Pacheco M, Simons M, Medina M. Validación del inmuno ensayo enzimático (ELISA) y hemaglutinación indirecta (HAI) para el serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Salus*. 2002;6:4–9.
29. Otani MM, Vinelli E, Kirchhoff LV, del Pozo A, Sands A, Vercauteren G, et al. WHO comparative evaluation of serologic assays for Chagas disease. *Transfusion*. 2009;49:1076–82.
30. Vásquez JE, Krusnell J, Orn A, Sousa OE, Harris RA. Serological diagnosis of *Trypanosoma rangeli* infected patients. A comparison of different methods and its implications for the diagnosis of Chagas' disease. *Scand J Immunol*. 1997;45:322–30.
31. Gil J, Pavía P, Montilla M, Florez AC, Quintero C, Mercado M, et al. Comparison of a PCR test based on the histone H2A/SIRE genes with classical serological tests for the diagnosis of chronic Chagas disease in Colombian patients. *Biomédica (Bogotá)*. 2007;27:83–91.
32. Telleria J, Lafay B, Virreira M, Barnabé C, Tibayrenc M, Svoboda M. *Trypanosoma cruzi*: sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. *Exp Parasitol*. 2006;114:279–88.
33. Elías C, Vargas N, Zingales B, Schenkman S. Organization of satellite DNA in the genome of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 2003;129:1–9.
34. Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejía Jaramillo AM, et al. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5:e931.
35. Piron M, Fisa R, Casamitjana N, López-Chejade P, Puig L, Vergés M, et al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop*. 2007;103:195–200.
36. Ramírez JD, Guhl F, Umezawa ES, Morillo CA, Rosas F, Marin-Neto JA, et al. Evaluation of adult chronic Chagas' heart disease diagnosis by molecular and serological methods. *J Clin Microbiol*. 2009;47:3945–51.
37. Murcia L, Carrilero B, Muñoz MJ, Iborra MA, Segovia M. Usefulness of PCR for monitoring benznidazole response in patients with chronic Chagas' disease: a prospective study in a non-disease-endemic country. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65:1759–64.
38. Norman FF, Pérez-Ayala A, Pérez-Molina JA, Flores-Chavez M, Cañavate C, López-Vélez R. Lack of association between blood-based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA and cardiac involvement in a non-endemic area. *Ann Trop Med Parasitol*. 2011;105:425–30.
39. Wincker P, Telleria J, Bosseno MF, Cardoso MA, Marques P, Yaksic N, et al. PCR-based diagnosis for Chagas' disease in Bolivian children living in an active transmission area: comparison with conventional serological and parasitological diagnosis. *Parasitology*. 1997;3114:367–73.
40. Aguiar C, Batista AM, Pavan TB, Almeida EA, Guariento ME, Wanderley JS, et al. Serological profiles and evaluation of parasitaemia by PCR and blood cultura in individuals chronically infected by *Trypanosoma cruzi* treated with benznidazole. *Trop Med Int Health*. 2012;17:368–73.
41. Diez CN, Manattini S, Zanuttini JC, Bottasso O, Marcipar I. The value of molecular studies for the diagnosis of congenital Chagas disease in north-eastern Argentina. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;78:624–7.