

# DIAGNÓSTICO DE CHAGAS POR ELISA. COMPARACIÓN ENTRE ENSAYOS COMERCIALES PRODUCIDOS POR TECNOLOGÍA TRADICIONAL Y TECNOLOGÍA RECOMBINANTE

René Díaz<sup>1</sup>, Ilse Müller<sup>1</sup>, Ximena Coronado<sup>2</sup>, Gittith Sánchez<sup>2</sup>, Inés Zulantay<sup>2</sup>, y Edith Hevia<sup>1</sup>.  
<sup>1</sup>BiosChile I.G.S.A. <sup>2</sup>Programa Biología Celular y Molecular ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

## RESUMEN

La detección de anticuerpos séricos anti *T. cruzi* por ELISA es la técnica de mayor uso en Bancos de Sangre para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Actualmente existen en el mercado ensayos de ELISA para Chagas de tipo tradicionales basados en el uso de extractos del parásito y que reconocen inmunoglobulinas del tipo IgG y otros basados en el uso de antígenos recombinantes y capaces de detectar IgG e IgM. Con el objeto de estudiar estos diferentes ensayos, se analizaron sueros y plasmas humanos con 4 ensayos de ELISA comerciales, dos de ellos basados en tecnología tradicional y dos en base a antígenos recombinantes. De 626 muestras analizadas 605 dieron resultados similares con los cuatro ensayos y 21 muestras dieron resultados diferentes al menos con uno de ellos. Estas últimas fueron analizadas por Western blot, IFI y ELISA usando formas tripomastigotas del parásito. Los resultados obtenidos muestran una mejor sensibilidad y especificidad de los ensayos basados en extracto total del parásito y sugieren la necesidad de analizar con más detalle las tecnologías usadas en los ensayos basados en antígenos recombinantes.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es una zoonosis endémica de América Latina producida por el parásito *Trypanosoma cruzi* y afecta a millones de personas. Esta se caracteriza por una diversidad de manifestaciones clínicas entre las que destacan miocardiopatías y alteraciones del sistema digestivo. La mayor parte de los individuos afectados son crónicos asintomáticos y constituyen un riesgo potencial para la transmisión transfusional, la cual representa el segundo mecanismo de transmisión del parásito.

Con el fin de evitar la transmisión transfusional, las donaciones de sangre recibidas en la zona endémica son analizadas mediante la detección de anticuerpos séricos anti-*T. cruzi*. Para esto se utilizan diferentes tecnologías siendo el ELISA la más difundida dado su alta sensibilidad, especificidad y simplicidad.

En general las técnicas disponibles para la detección de anticuerpos dirigidos contra *T. cruzi* están basadas en extractos de la forma epimastigota del parásito. Últimamente han aparecido en el mercado ensayos de ELISA basados en antígenos recombinantes que se expresan en las formas que parasitan a mamíferos (tripomastigotes o amastigotes) y que pueden detectar inmunoglobulinas totales o IgG + IgM.

## OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue comparar ensayos de ELISA comerciales basados en extractos de epimastigotes que detectan anticuerpos séricos anti-*T. cruzi* del tipo IgG, con ensayos de ELISA comerciales basados en antígenos recombinantes y capaces de detectar inmunoglobulinas totales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Ensayos de ELISA comerciales:** Los ensayos se realizaron de acuerdo a lo indicado por cada proveedor. Los resultados se presentan como Absorbancia/cut off (A/co). Para los 4 ELISAs se consideró positivo un resultado superior a 1,0 A/co, negativo un resultado inferior a 0,9 A/co y zona gris los resultados entre 0,9 y 1,0 A/co. El análisis se hizo considerando la zona gris como positiva

Tabla I

| Muestras Evaluadas       | n   |
|--------------------------|-----|
| Sueros BiosChile         | 368 |
| Plasmas positivos Brasil | 100 |
| Plasmas Argentina        | 48  |
| Plasmas frescos          | 75  |
| Sueros autoinmune        | 35  |
| Total                    | 626 |

**IFI:** Se realizó con epimastigotes de la cepa Mf, usando un conjugado anti- IgG humana unido a FITC.

**Western Blot:** Se realizó con extractos de epimastigotes de las cepas Mn y Tulahuén, usando un conjugado anti-IgG humana unido a peroxidasa, las muestras se diluyeron 100 veces.

**ELISA tripomastigotes:** Los tripomastigotes de la cepa Mf, se cultivaron en células Vero, el ELISA se preparó de acuerdo a los protocolos de BiosChile.

Tabla II

| Ensayos de ELISA comerciales estudiados |                            |       |               |           |
|---|----------------------------|-------|---------------|-----------|
| ELISA                                   | BiosChile                  | Lemos | Wiener        | Biokit    |
| Antígeno                                | Extractos de epimastigotes |       | Recombinantes |           |
| Inmunoglobulinas detectadas             | IgG                        |       | Totales       | IgG + IgM |

## RESULTADOS

Como se aprecia en la Tabla III, de las 626 muestras analizadas, 21 dieron resultados discordantes. Un análisis más detallado de éstas se presenta en la Tabla IV. El análisis final de los resultados se muestra en la tabla V.

Tabla III

| Número de muestras reactivas |     |
|------------------------------|-----|
| En los 4 ELISA               | 268 |
| En 3 de los ELISA            | 5   |
| En 2 de los ELISA            | 0   |
| Solo en 1 ELISA              | 16  |
| En ninguno de los 4 ELISA    | 337 |
| Total                        | 626 |

Tabla IV

| Muestras con Resultados Discordantes |                         |       |                     |        |              |     |          |                       |
|--------------------------------------|-------------------------|-------|---------------------|--------|--------------|-----|----------|-----------------------|
| Muestras                             | ELISA extractos totales |       | ELISA recombinantes |        | Western blot |     | IFI      | ELISA tripomastigotes |
|                                      | BiosChile               | Lemos | Wiener              | Biokit | blot         | IFI |          |                       |
| 00098                                | 0,42                    | 1,03  | 0,18                | 0,41   | -            | -   | -        | 0,32                  |
| PUC78291                             | 0,34                    | 0,15  | 2,79                | 0,13   | -            | -   | -        | 0,43                  |
| Arg09163                             | 0,28                    | 0,22  | 1,32                | 0,04   | -            | -   | -        | 0,30                  |
| Arg10832                             | 0,30                    | 0,11  | 1,19                | 0,10   | -            | -   | -        | 0,55                  |
| Arg09646                             | 0,35                    | 0,12  | 1,54                | 0,05   | -            | -   | -        | 0,30                  |
| Arg08454                             | 0,45                    | 0,38  | 1,15                | 0,06   | -            | -   | -        | 0,36                  |
| Arg10625                             | 0,30                    | 0,17  | 1,10                | 0,19   | -            | -   | -        | 0,28                  |
| Arg10769                             | 0,36                    | 0,12  | 2,79                | 0,13   | -            | -   | -        | 0,63                  |
| Arg10206                             | 0,35                    | 0,26  | 1,36                | 0,13   | -            | -   | -        | 0,40                  |
| Arg09589                             | 0,56                    | 0,60  | 2,37                | 0,09   | -            | -   | -        | 0,36                  |
| Autoin28                             | 0,25                    | 0,27  | 0,25                | 1,32   | -            | -   | 1:20 +/- | 0,28                  |
| Autoin48                             | 0,61                    | 1,37  | 0,54                | 0,16   | -            | -   | 1:80     | 0,45                  |
| Autoin79                             | 0,51                    | 1,02  | 0,59                | 0,12   | -            | -   | 1:80     | 0,31                  |
| Arg09099                             | 0,48                    | 0,37  | 1,40                | 0,28   | -            | -   | 1:40     | ND                    |
| 9156112                              | 0,40                    | 0,27  | 0,51                | 2,50   | -            | -   | 1:20 +/- | 0,33                  |
| 9156211                              | 0,71                    | 0,64  | 2,01                | 0,85   | +            | -   | -        | 0,60                  |
| 00076                                | 1,03                    | 1,01  | 2,42                | 0,11   | -            | -   | -        | 0,72                  |
| 00025                                | 0,90                    | 0,97  | 0,03                | 2,85   | -            | -   | -        | 0,88                  |
| Arg10594                             | 1,00                    | 0,99  | 0,54                | 2,72   | +            | -   | 1:40     | ND                    |
| 9858                                 | 1,17                    | 1,87  | 0,29                | 0,98   | +            | +   | -        | 0,98                  |
| SCH29                                | 1,37                    | 1,35  | 3,44                | 0,22   | +            | -   | -        | 1,25                  |

A: Muestras negativas : Reactivas sólo con 1 de los ensayos utilizados y sueros autoinmunes  
 B: Muestras indeterminadas : Reactivas por dos o tres del total de ensayos utilizados  
 C: Muestras positivas : Reactivas con al menos 5 del total de ensayos utilizados

zona gris positivo negativo

Tabla V

| Análisis de resultados     |                            |        |                     |        |       |                           |
|----------------------------|----------------------------|--------|---------------------|--------|-------|---------------------------|
| Muestras                   | ELISA basados en extractos |        | ELISA recombinantes |        | total | Sensibilidad <sup>1</sup> |
|                            | BiosChile                  | Lemos  | Wiener              | Biokit |       |                           |
| positivas                  | 271                        | 0      | 271                 | 2      | 270   | 1                         |
| negativas                  | 0                          | 350    | 3                   | 347    | 9     | 341                       |
| indeterminados             | 5                          | 2      | 3                   | 2      | 2     | 3                         |
| total                      | 626                        | 626    | 626                 | 626    | 626   | 626                       |
| Especificidad <sup>1</sup> | 100,0%                     | 100,0% | 99,3%               | 99,6%  |       |                           |
|                            | 100,0%                     | 99,1%  | 97,4%               | 99,7%  |       |                           |

1: No se consideró las muestras indeterminadas

## CONCLUSIONES

- Uno de los ensayos basados en tecnología recombinante fue el que presentó la más baja correlación con las técnicas de confirmación usadas.
- Cinco muestras fueron definidas como indeterminadas.
- Estos resultados y la falta de ensayos de confirmación concluyentes, justifican el estudio de nuevas técnicas y el mejoramiento de las existentes.
- La mayor sensibilidad se obtuvo con los ensayos basados en extractos del parásito.