



EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO DE TÉCNICAS ELISA PARA LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN COLOMBIA

INVESTIGADOR PRINCIPAL
RICARDO ANDRÉS CAICEDO DÍAZ

ASESOR METODOLÓGICO
OSCAR ALBERTO BERNAL

ASESOR TEMÁTICO
ASTRID CAROLINA FLÓREZ SÁNCHEZ

UNIVERSIDAD DEL ROSARIO
ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD

UNIVERSIDAD CES
FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRÍA EN EPIDEMIOLOGÍA

BOGOTÁ D.C.
MAYO DE 2017

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO DE TÉCNICAS ELISA PARA LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN COLOMBIA

Trabajo de investigación para optar al título de Magister en Epidemiología
presentado por:

RICARDO ANDRÉS CAICEDO DÍAZ
Bacteriólogo y Laboratorista Clínico
Instituto Nacional de Salud

ASESOR METODOLÓGICO
OSCAR ALBERTO BERNAL
MD, MPH, PhD
Global Health Consultant

ASESOR TEMÁTICO
ASTRID CAROLINA FLÓREZ SÁNCHEZ
Profesional especializado MSc.
Referente evento Chagas Laboratorio Nacional de Referencia
Instituto Nacional de Salud. Bogotá. Colombia

UNIVERSIDAD DEL ROSARIO
ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD

UNIVERSIDAD CES
FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRÍA EN EPIDEMIOLOGÍA

BOGOTÁ D.C.
MAYO DE 2017

NOTA DE SALVEDAD DE RESPONSABILIDAD INSTITUCIONAL

“Las universidades del Rosario y CES, no se hacen responsables de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo; solo velarán por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, a Dios por permitirme ser un instrumento de trabajo para el mejoramiento de la calidad de vida de las personas víctimas de la Enfermedad de Chagas.

A la Universidad del Rosario, Universidad CES, a sus docentes e investigadores y a mis compañeros por brindarme las mejores herramientas académicas, científicas y personales para el desarrollo de la presente investigación.

A mi asesor metodológico Oscar Bernal y asesor temático Carolina Flórez por la dedicación, profesionalismo y seriedad con que dirigieron esta investigación, además de infundir en mí siempre la honestidad y el rigor científico.

También quisiera agradecer especialmente a Mauricio Beltrán, Director de Redes en Salud Pública del INS Colombia, Andrea Marchiol y Colin Forsyth del DNDi y Mauricio Javier Vera del Ministerio de Salud y Protección Social Colombia, por su apoyo incondicional para el desarrollo total de esta investigación.

A los profesionales del INS, Andrea Herrera y María Isabel Bermúdez, Red Nacional de Bancos de Sangre por su contribución a este trabajo.

A Carolina Batista, Rafael Herazo y Carlos Andrés Valencia del DNDi, por su gran acompañamiento durante este proceso.

A Zulma Cucunubá y María Isabel Jercic, asesores internacionales que de la misma manera contribuyeron con su amplia experiencia a construir este proyecto.

A Eduin Pachón del Ministerio de Salud y Protección Social y Juan Carlos Villar de la Fundación Cardioinfantil, por sus valiosos aportes realizados.

Al Hemocentro Distrital a través de su director Bernardo Camacho, quien también gentilmente aportó en este trabajo.

Al Doctor Pedro Albajar Viñas, de la Organización Mundial de la Salud que contribuyo y consideró este estudio un gran aporte para la salud pública del país.

Finalmente, a mi familia quienes constantemente me alentaron con su amor y cariño.

ÍNDICE DEL CONTENIDO

RESUMEN.....	13
ABSTRACT	14
1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	15
1.1. Introducción	15
1.2. Planteamiento del problema	18
1.3. Justificación	21
1.4. Pregunta de investigación	23
1.4.1 Preguntas secundarias	23
2. MARCO TEORICO.....	24
2.1. Generalidades	24
2.2. Mecanismos de transmisión	25
2.3. Epidemiología	26
2.4. Fases clínicas	30
2.4. Variabilidad genética	31
2.5. Diagnóstico	33
2.6. TRATAMIENTO	39
3. HIPOTESIS	40
4. OBJETIVOS	41
4.1. General	41
4.2. Específicos	41
5. METODOLOGÍA.....	42
5.1. Enfoque metodológico del estudio.....	42
5.2. Tipo y diseño del estudio	42
5.2.1. Estimadores	43
5.3. Población	43

5.4. Diseño muestral	43
5.4.1. Muestra	43
5.4.1.1. Criterios de selección	47
5.4.1.1.1. Criterios de inclusión	47
5.4.1.1.2. Criterios de exclusión	48
5.4.2. Cálculo del tamaño de la muestra.....	48
5.4.3. Técnicas serológicas para caracterización de muestras	49
5.4.4. Definición del valor por el patrón de referencia.....	50
5.4.4.1. Valor de referencia establecido por pruebas de laboratorio	50
5.4.4.2. Criterios adicionales	52
5.4.5. Procedimiento de disposición de las muestras	52
5.4.5.1. Selección de las muestras.....	52
5.4.5.2. Extracción, organización, etiquetado y almacenamiento	53
5.4.5.3. Consideraciones generales del procesamiento.....	53
5.4.5.4. Descripción de las muestras	54
5.4.6. Reactivos (pruebas evaluadas) y equipos utilizados	56
5.4.6.1. Pruebas de ELISA	56
5.4.6.2. Equipos utilizados.....	59
5.5. Descripción de las variables	61
5.6. Técnicas de recolección de información.....	61
5.6.1. Fuente de información	61
5.6.2. Instrumento de recolección de información	61
5.6.3. Proceso de la obtención de la información	62
5.7. Control de errores y sesgos.....	62
5.8. Técnicas de procesamiento y análisis de datos	64
5.8.1. Procesamiento de datos	64
5.8.2. Análisis de datos	64
5.8.2.1. Estimación de características operativas individuales	64
5.8.2.2. Estimación de características operativas de los binomios	65

5.8.2.3. Predicciones del rendimiento en simulación en población y prevalencia determinada	65
5.8.2.3.1. Análisis en serie	65
5.8.2.3.2. Análisis en paralelo	67
6. CONSIDERACIONES ÉTICAS	69
7. RESULTADOS	70
7.1. Características operativas individuales	70
7.2. Prueba de repetibilidad	74
7.3. Características operativas de técnicas en binomios	74
7.4. Predicciones del desempeño de los binomios.....	75
8. DISCUSIÓN.....	81
9. CONCLUSIONES.....	91
REFERENCIAS	93
ANEXOS	99

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución global de Enfermedad de Chagas	27
Figura 2. Fases de la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
Figura 3. Muestras de suero seropositivos provenientes de brotes.....	51
Figura 4. Distribución de las muestras según fuente	54
Figura 5. Diagrama de flujo y tiempos del estudio	59
Figura 6. Sensibilidad de técnicas ELISA	73
Figura 7. Especificidad de técnicas ELISA.....	73
Figura 8. Coeficientes de variación de técnicas ELISA con muestras positivas	74
Figura 9. Algoritmo serológico clásico: ELISA antígenos totales seguido por IFI ..	78
Figura 10. Nuevo algoritmo serológico: ELISA antígenos totales seguido por ELISA antígenos recombinantes	78
Figura 11. Algoritmo de diagnóstico serológico propuesto para la Enfermedad de Chagas en Colombia.....	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Casos de Enfermedad de Chagas en fase crónica a 2016	29
Tabla 2. Proteínas recombinantes y péptidos sintéticos de <i>T. cruzi</i> con uso potencial clínico y epidemiológico.	37
Tabla 3. Rendimiento diagnóstico de ensayos serológicos usando diferentes combinaciones de proteínas recombinantes o péptidos sintéticos de <i>T. cruzi</i> .	38
Tabla 4. Reactividad de estándares internacionales NIBCS - OMS	47
Tabla 5. Distribución porcentual del cálculo de la muestra	49
Tabla 6. Distribución porcentual y características de muestras de Seroteca LNR Parasitología	55
Tabla 7. Técnicas ELISA sometidas a estudio	57
Tabla 8. Especificaciones técnicas de pruebas ELISA	58
Tabla 9. Equipos utilizados, especificaciones y trazabilidad metrológica	60
Tabla 10. Resultados de técnicas ELISA evaluadas frente a patrón de referencia	70
Tabla 11. Tasa de falsos negativos y muestras relacionadas.....	71
Tabla 12. Tasa de falsos positivos y muestras relacionadas	72
Tabla 13. Predicciones en serie del comportamiento de pruebas ELISA	76
Tabla 14. Predicciones en paralelo del comportamiento de pruebas ELISA	77
Tabla 15. Resultados de comparación de algoritmo clásico y algoritmo nuevo.....	79
Tabla 16. Características operativas de las pruebas de ELISA	104
Tabla 17. Características operativas de combinaciones en serie	105
Tabla 18. Características operativas de combinaciones en paralelo	106
Tabla 19. Predicción del comportamiento de las pruebas de ELISA en serie	108
Tabla 20. Predicción del comportamiento de las pruebas de ELISA en paralelo	113

LISTADO DE ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
DNDi	Drugs for Neglected Diseases initiative
DTU	Unidades Discretas de Tipificación
E	Especificidad
ECh	Enfermedad de Chagas
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
EPS	Entidad Promotora de Salud
HAI	Hemaglutinación indirecta
IFI	Inmunofluorescencia Indirecta
INS	Instituto Nacional de Salud
INVIMA	Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos
IPS	Institución Prestadora del Servicio
LDSP	Laboratorio Departamental de Salud Pública
LNR	Laboratorio Nacional de Referencia
LR-	Negative Likelihood Ratio – Razón de verosimilitud negativa
LR+	Positive Likelihood Ratio – Razón de verosimilitud positiva
MAIS	Modelo de Atención Integral de Salud
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PAIS	Política Integral de Atención en Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RIAS	Rutas de Atención Integral en Salud
S	Sensibilidad
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
VPN	Valor Predictivo Negativo
VPP	Valor Predictivo Positivo

GLOSARIO

ANTÍGENO: molécula capaz de estimular la producción de un anticuerpo y provocar una respuesta inmunitaria.

ANTÍGENO RECOMBINANTE: proteínas provenientes de ADN recombinante del *T. cruzi*, traducidas por plásmidos y purificadas por técnicas de biología molecular.

ANTÍGENO TOTAL: grupo completo de moléculas de una célula que estimula la producción de un anticuerpo y desencadena una respuesta inmunitaria.

CARACTERÍSTICAS OPERATIVAS: atributos estadísticos que miden el desempeño diagnóstico de una prueba utilizada para el diagnóstico.

CONFIABILIDAD: también llamada reproducibilidad de una prueba implica la cantidad de error que se comete al realizar la medición. Se puede encontrar la confiabilidad intra-analista o inter-analista.

ESPECIFICIDAD: proporción de personas verdaderamente no enfermas que han sido catalogadas como tales mediante una prueba diagnóstica.

EXACTITUD: proporción de individuos clasificados correctamente.

LIKELIHOOD RATIO POSITIVE (LR+): índice que indica cuantas veces es más probable que la prueba sea positiva en los individuos enfermos que en los no enfermos.

LIKELIHOOD RATIO NEGATIVE (LR-): índice que indica cuantas veces es más probable que la prueba sea negativa en los individuos enfermos que en los no enfermos.

PÉPTIDOS SINTÉTICOS: unión de aminoácidos mediante enlaces peptídicos, sintetizados artificialmente mediante procesos biológicos.

RENDIMIENTO DE PRUEBAS DIAGNOSTICAS: es la capacidad evidenciada de las pruebas diagnósticas para configurar adecuadamente los pacientes en condiciones locales, frente a condiciones aleatorias y variables de contexto o paciente. Una técnica con buen rendimiento, hace referencia a una prueba que en



diferentes condiciones ambientales, analista o muestra pueda detectar la presencia o ausencia de lo que se está investigando.

SENSIBILIDAD: proporción de personas verdaderamente enfermas que han sido catalogadas como tales mediante una prueba diagnóstica.

TÉCNICAS CONVENCIONALES: pruebas de ELISA configuradas con extractos de antígenos totales o crudos provenientes del parásito.

TÉCNICAS NO CONVENCIONALES: pruebas de ELISA configuradas con antígenos recombinantes, antígenos purificados o péptidos sintéticos.

VALIDEZ: capacidad de una prueba diagnóstica para detectar correctamente la presencia o ausencia de la enfermedad en cuestión y si esta realmente esta cumple la función para la cual fue diseñada, se expresa matemáticamente con índices como sensibilidad y especificidad, entre otras.

VALOR PREDICTIVO POSITIVO: probabilidad condicional que los individuos con una prueba positiva tengan realmente la enfermedad.

VALOR PREDICTIVO NEGATIVO: probabilidad condicional que los individuos con una prueba negativa no tengan realmente la enfermedad.

RESUMEN

Introducción: La enfermedad de Chagas es producida por el *Trypanosoma cruzi*, endémica en América Latina. Comienza con una fase aguda seguida por una fase crónica que dura toda la vida, puede producir complicaciones cardíacas o gastrointestinales en 30 a 40% de los infectados. El diagnóstico es complejo, lo cual constituye una barrera al acceso actualmente. El método recomendado por la OMS en fase crónica es una combinación de dos pruebas inmunoserológicas con diferentes configuraciones antigénicas. El procedimiento actual en Colombia es la tamización con una ELISA y la confirmación con una IFI.

Objetivo: Evaluar el rendimiento diagnóstico de siete pruebas de ELISA convencionales y no convencionales para la detección de anticuerpos anti- *T. cruzi*.

Metodología: Estudio observacional analítico de pruebas diagnósticas, donde se usaron 501 muestras de suero de personas colombianas, se estimaron características operativas de pruebas ELISA individualmente y en binomios para configurar un nuevo algoritmo de diagnóstico serológico, en muestras de pacientes colombianos frente a métodos de referencia del Instituto Nacional de Salud de Colombia

Resultados: La sensibilidad de pruebas individuales fue entre 92,5% a 99,6% y especificidad entre 94,6% a 97,9%. En relación a las combinaciones, se observó que la sensibilidad aumenta en pruebas en paralelo, mientras la especificidad aumenta en pruebas en serie, llegando incluso al 99,9% con algunos binomios.

Discusión: La prueba de antígenos totales tuvo un alto desempeño para el tamizaje de la población general colombiana. La mayoría de las pruebas de antígenos recombinantes resultaron adecuadas para la confirmación de casos sospechosos, de una manera igual a la IFI.

Conclusión: El rendimiento de la mayoría de las pruebas fue adecuado, por tanto, el binomio debe estar constituido por antígenos totales como primera prueba y como prueba complementaria una de antígenos recombinantes o péptidos sintéticos. De esta forma, se reemplaza la inmunofluorescencia indirecta como confirmatoria, eliminando barreras importantes en el acceso al diagnóstico en Colombia.

Palabras clave: *Enfermedad de Chagas, sensibilidad y especificidad, ensayo de inmunoadsorción enzimática.*

ABSTRACT

Introduction: Chagas disease is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, endemic in America Latina. It begins with an acute phase followed by a life-long chronic phase that causes cardiac and gastrointestinal complications in 30-40% of those infected. Diagnosis is complex, which currently poses a barrier to treatment access. The World Health Organization recommends chronic phase diagnosis with a combination of two serologic tests with different antigenic configurations. The current procedure in Colombia is initial screening with an ELISA with confirmation by an immunofluorescent assay (IFA).

Objective: Evaluate the diagnostic performance of seven conventional and unconventional ELISA tests for detection of *T. cruzi* antibodies.

Methodology: This was an observational study using 501 serum samples from Colombian patients which measured operational characteristics of ELISA tests individually and in binomial combinations against current procedures used by the Colombian National Institute of Health, to help configure a new serologic diagnostic algorithm.

Results: Individual sensitivity ranged from 92.5 to 99.6%, and specificity ranged from 94.6 to 97.9%. Use of simultaneous binomial combinations produced higher sensitivity, while specificity was increased with sequential combinations, up to 99.9% in some cases.

Discussion: Total antigen assays performed well for screening of the general Colombian population. Their antigenic configuration permits detection of the majority of positive patients. The majority of recombinant tests were adequate for detection of suspected cases, performing nearly as well as the IFA.

Conclusion: Performance of most of test was appropriate, therefore, two-stage testing should consist of a total antigen assay in the first stage followed by a recombinant or synthetic peptide test. This would allow for replacement of the indirect immunofluorescence assay as a confirmatory test, eliminating an important barrier to diagnosis in Colombia.

Key words: Chagas Disease, sensitivity and specificity, enzyme-linked immunosorbent assays.

1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

1.1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas (ECh) es una enfermedad zoonótica producida por la infección del parásito *Trypanosoma cruzi* (*T.cruzi*) y transmitida generalmente por contacto con las heces de los vectores triatomíneos, sangre y/o secreciones de reservorios infectados, por otras vías como la transfusional y/o trasplante de órganos y por medio de transmisión oral con alimentos infectados (1–3)

Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se encuentran alrededor de 5.742.167 personas infectadas en América Latina, encontrándose ampliamente distribuida en la mayoría de los países. Es una enfermedad que representa cierto grado de complejidad a la hora de realizar un diagnóstico veraz y oportuno, así como su tratamiento, manejo y seguimiento, convirtiéndose así en un problema de salud pública, dejando una gran carga de morbilidad y discapacidad; estudios han indicado evidencia que la Enfermedad de Chagas está asociada estadísticamente con un exceso de mortalidad y anualmente la tasa de mortalidad se incrementa con la severidad clínica (5).

La ECh está incluida por la OMS en el grupo de enfermedades desatendidas, las cuales se perpetúan en entornos de climas tropicales y húmedos, ambientes con francas limitaciones en saneamiento básico, condiciones ambientalmente insalubres, constante contaminación ambiental y dificultades en el acceso a agua potable, sin dejar atrás el difícil acceso en atención primaria en salud, condiciones que caracterizan a las poblaciones con pobreza extrema (1,2).

La enfermedad cursa con una etapa aguda que ocurre pocos días después del ingreso del parásito al torrente sanguíneo, el 90% de los pacientes infectados son asintomáticos, algunas veces es caracterizada por malestar general y fiebre por más de siete días, entre otros síntomas, cuando se hace evidente esta fase sin un tratamiento etiológico, puede llegar a ser mortal; la fase crónica va desde la ausencia de signos y síntomas (forma indeterminada) a enfermedad grave y muerte prematura y las manifestaciones clínicas típicas están relacionados con la afectación patológica de corazón, esófago, colon, o una combinación, y son agrupadas en tres formas principales: cardíaca, digestiva y cardio-digestiva (1,2,6).

Los métodos diagnósticos a utilizar dependen de la fase clínica de la enfermedad, bajo sospecha de fase aguda los métodos a utilizar deben ser los parasitológicos directos, tales como la observación del parásito en preparaciones de sangre fresca o métodos moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (6,7). Sin embargo, la alternativa del diagnóstico de una fase aguda en caso de no ser posible el uso de los métodos parasitológicos, es la práctica de los métodos serológicos, teniendo en cuenta la gran antigenicidad del *T.cruzi* que permite detectar después de pocos días de la infección, anticuerpos frente a distintos antígenos del parásito (8–10).

El diagnóstico confirmatorio de la fase aguda también puede ser realizado por seroconversión de un resultado negativo a positivo entre dos pruebas pareadas con 30 a 90 días de intervalo, insistiendo inicialmente en las pruebas parasitológicas, pero constituye una alternativa y una gran herramienta en caso de no ser posible confirmar la parasitemia (9,11).

A lo largo de los años los métodos serológicos a través de los cuales se determinan los anticuerpos anti *T. cruzi* han evolucionado, desde el año 1913 cuando Guerreiro y Machado prepararon un antígeno para la reacción de fijación de complemento, hasta la fecha donde existen las llamadas pruebas convencionales de extractos antigénicos totales, lisados o crudos del parásito completo como la ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*), la IFI (*Inmunofluorescencia Indirecta*) y la HAI (Hemaglutinación Indirecta) y las no convencionales de antígenos recombinantes y péptidos sintéticos o purificados que se encuentran disponibles en el mercado; cada uno de estos métodos tiene una configuración diferente en relación a su composición antigénica, forma de evidenciar la reacción y método de lectura. Según la configuración de las mismas, algunas suelen gozar de mejor sensibilidad y otras de mejor especificidad (6,12,14,15).

Las técnicas de ELISA, se han utilizado en el diagnóstico de enfermedades infecciosas desde la década de los 70, considerándose metodologías altamente sensibles (95%), que no necesitan gran infraestructura, ni equipos biomédicos especializados, además los profesionales que realizan los ensayos se pueden capacitar fácilmente. En conclusión, son ensayos rápidos y fiables que pueden otorgar seguridad a la hora de un diagnóstico (6,16,17).

Desde los años 80, con el avance de la tecnología del ADN recombinante, fue necesario el mejoramiento de las pruebas serológicas por varios motivos, a) para la detección de donantes infectados con *T.cruzi*, b) el adecuado diagnóstico y

tratamiento de los pacientes infectados y c) la vigilancia de las gestantes en riesgo de infección, asimismo esta tecnología recombinante se implementó como una herramienta para evitar las reacciones cruzadas que se pueden presentar con las técnicas convencionales con otros parásitos, principalmente *Leishmania sp.* y *Trypanosoma rangeli*, disminuyendo los posibles falsos positivos e incrementando su especificidad a pesar de comprometerse su sensibilidad (18,19).

El *T. cruzi* es un parásito protozoo con una gran diversidad genética que permitió la conformación en seis grupos diferentes llamados DTUs (Unidades Discretas de Tipificación) nombrados TcI a TcVI. En Colombia, predomina el linaje TcI que circula en ciclos selváticos y domésticos, sin embargo, estudios en pacientes en fase crónica demuestran coinfección de TcI-TcII, TcI-TcIV, así como la presencia única de TcII (20–22). Se ha evidenciado que las miocarditis moderadas en Argentina están relacionadas con TcII, TcV y TcVI, mientras que las miocarditis graves al igual que en Colombia están relacionadas con TcI (21). En un reciente estudio se evidenció que los pacientes pueden presentar poliparasitismo o coinfección detectándose infecciones mixtas antes del tratamiento y en algunos pacientes fue identificada una segunda DTU después del tratamiento diferente a la inicial, concluyendo que las DTU detectadas en un mismo paciente pueden variar con el tiempo, indicando que el poliparasitismo puede ser frecuente (22, 23).

Es importante tener en cuenta que la respuesta inmune se puede afectar en los pacientes inmunocomprometidos por procesos naturales o patológicos, sin embargo, todo paciente susceptible de recibir o donar un órgano, que padezca enfermedades autoinmunes o inmunosupresión por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) deberá ser estudiado por métodos serológicos (9,10).

Teniendo en cuenta que la infección con *T. cruzi* de la madre es un elemento necesario en el origen de un caso congénito y dado que en Colombia se han caracterizado zonas endémicas como el departamento del Casanare donde fue hallada una prevalencia global en madres de 4,0%, las medidas de control clínico deben iniciar antes del nacimiento del bebé, a través de la evaluación de toda mujer embarazada (10,24). Aunque se estima que la transmisión de *T. cruzi* durante el embarazo ocurre en menos del 20% de las madres infectadas, se han reportado prevalencias del 5% en el sur de Brasil, 2% en el centro de Brasil y una tasa de transmisión del 4–6% en Argentina, Bolivia y Paraguay, asimismo se puede presentar incluso, en zonas donde la transmisión vectorial ha sido interrumpida (25,26).

En los recién nacidos de madres infectadas y asintomáticos, siempre y cuando sea posible se debe realizar investigación del *T. cruzi* mediante pruebas parasitológicas, si sus resultados son negativos o no fue posible practicarlas, deberán ser repetidas en lo posible durante los primeros tres meses después de nacer o recurrir a las pruebas serológicas 10 meses después de su nacimiento, un diagnóstico serológico positivo a esta edad implicará la necesidad de iniciar un tratamiento antiparasitario, pero un diagnóstico serológico negativo excluirá completamente la infección (8,10,12,27).

A pesar de los continuos avances, según OMS ningún ensayo serológico alcanza por si solo 100% de sensibilidad y 100% de especificidad, razón por la cual el diagnóstico serológico se basa en la concordancia de al menos dos técnicas de principio antigénico diferente (1,2,8,28).

Existen muchas alternativas en el uso de las técnicas de ELISA en laboratorios clínicos y bancos de sangre en Colombia, tanto en zonas endémicas como no endémicas. Sin embargo, en la práctica con estudios de desempeño diagnóstico, unos bajos valores de sensibilidad o especificidad o problemas de diagnóstico debidos a una baja prevalencia se compensarán con el diseño muestral o a nivel individual combinando pruebas de diagnóstico ya sea tanto en paralelo como en serie. La selección de las pruebas, el proceso de muestreo, la combinación de pruebas y la forma de interpretación de los resultados harán posible una definición completa del diagnóstico (29,30).

1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En Colombia, se inició de manera progresiva posterior a la publicación del informe técnico de expertos de la OMS del año 2002 la implementación de las pruebas convencionales (ELISA e IFI) para el diagnóstico de la ECh, en este informe se recomendó para establecer un paciente como infectado, contar con mínimo dos pruebas positivas de diferente principio y en caso de una discrepancia realizar una tercera prueba.

El Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) del Instituto Nacional de Salud (INS), en calidad de laboratorio referente de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública en Colombia, adoptó y estandarizó las técnicas de ELISA e IFI con antígenos extraídos de cepas de *T. cruzi* provenientes de pacientes autóctonos de diferentes regiones del país; a pesar de ser pruebas con alta sensibilidad y especificidad, éstas generaron en su uso barreras en el acceso, dado que la IFI

corresponde a una técnica con un alto nivel de requerimientos técnicos en el laboratorio (31).

A pesar de los grandes esfuerzos desarrollados por más de una década para que las entidades territoriales contaran con los insumos, equipos, infraestructura y recurso humano para realizar estos ensayos, Cucunubá et al., 2017 indica que entre el 2012 y 2014 el promedio de ejecución de pruebas de confirmación después de realizada la primera prueba fue del 68% (32). Fue hasta el año 2015 cuando se documentó y divulgó a través del seminario “*Hacia la Eliminación de las Barreras en el Acceso al Diagnóstico y Tratamiento de Enfermedad de Chagas en Colombia*” en Bogotá, que la barrera inicial existente era la confirmación diagnóstica de los pacientes sospechosos con ECh.

Posterior a esto, el INS a través del Programa Nacional de Enfermedad de Chagas ha unido esfuerzos junto con el Ministerio de Salud y Protección Social y con la Organización Panamericana de la Salud (OPS) entre otras entidades internacionales, como el Drugs for Neglected Diseases *initiative* (DNDi) para lograr el objetivo principal que corresponde al mejoramiento del acceso del diagnóstico, tratamiento integral y seguimiento de los pacientes a través de la descentralización de los procesos en las entidades territoriales y el fortalecimiento de las capacidades locales.

La IFI tiene varias limitaciones técnicas que dificultan su uso en todas o en la mayoría de las entidades territoriales del país, inicialmente la capacidad para producir el antígeno de *T.cruzi* en el LNR del INS, el cual resulta insuficiente para cubrir la demanda, se requieren reactivos de alto costo y de producción limitada, un microscopio de fluorescencia de un costo elevado en compra y mantenimiento, condiciones de infraestructura especiales y finalmente un entrenamiento específico para los profesionales que deseen realizar la prueba.

Por este motivo, el algoritmo de diagnóstico serológico para la ECh propuesto por la OMS en el año 2002, utilizando una ELISA convencional y una IFI, ha perdido su operatividad en Colombia y se ha limitado a pocos Laboratorios de Salud Pública Departamentales (LSPD), algunos centros de investigación y laboratorios privados. La falta de implementación de este algoritmo de diagnóstico en Colombia, ha traído consigo varias dificultades administrativas, técnicas y científicas que han afectado no solo al sistema de salud, si no directamente a los pacientes que necesitan de un oportuno diagnóstico.



La mayoría de los pacientes a quienes se les sospecha la ECh, son pacientes que residen en zonas rurales, los cuales deben tener más de cinco contactos con el sistema de salud para acceder a una prueba diagnóstica. Los pocos pacientes que acceden a ella, solo se les realiza la prueba de ELISA en un laboratorio clínico y pueden tardar entre seis meses y un año para que se les realice la IFI como prueba complementaria en otro laboratorio diferente. Las Entidades Promotoras de Salud (EPS) y las Instituciones Prestadoras del Servicio (IPS) no tienen el conocimiento suficiente en relación al diagnóstico para orientar a los pacientes en los procedimientos, por lo cual el paciente sin orientación administrativa desiste, perdiendo así la oportunidad de la confirmación diagnóstica, evaluación clínica y tratamiento. Para las pocas entidades que conocen el algoritmo de diagnóstico serológico pero no cuentan con los insumos y equipos necesarios para su ejecución, lamentablemente recurren a la tercerización del servicio, remitiendo las muestras a laboratorios clínicos privados de mayor infraestructura que utilizan tecnologías de las cuales se desconoce su desempeño diagnóstico y a la vez agravan la situación en términos de oportunidad, ya que los pacientes deben esperar aún más tiempo los reportes de resultados.

La transmisión congénita de la ECh es un problema en muchos países endémicos e inclusive no endémicos donde existe migración interna, en Colombia han sido pocos los estudios que han dado respuesta a esta problemática, una de las causas puede deberse al poco control que existe sobre las gestantes y por ende a los recién nacidos de las madres seropositivas. Estas dificultades podrían ser por la falta de tecnología que permita diagnosticar correctamente a las maternas, creando así una barrera fundamental en la estimación de la tasa de transmisión congénita en Colombia.

Finalmente, en relación a los donantes seropositivos, existe también una situación complicada, dado que de acuerdo a la Circular 082 del año 2011 del INS, los donantes deben ser confirmados en el Banco de Sangre y canalizados a las respectivas aseguradoras. Sin embargo, cuando llegan solicitando su tratamiento, son devueltos a una primera fase de diagnóstico, subestimando las acciones del Banco de Sangre, que se traducen finalmente en la pérdida del donante, el cual desiste del proceso, pero desafortunadamente ya se ha convertido desde su diagnóstico complementario en un paciente con ECh, el cual no va a ser tratado (33).

1.3. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Chagas genera un gran número de incapacidades, pérdidas de potencial humano en jóvenes y adultos, desmejoramiento en la calidad de vida, depresión emocional e incluso discriminación social y carga económica en el sistema de salud y anualmente cobra alrededor de 12.000 muertes en las Américas, Cucunubá et al., muestra que, comparando a las personas sin infección, con aquellas infectadas con *T.cruzi*, éstas tienen un exceso en la mortalidad del 42,5% (32,34,35).

Esta enfermedad durante muchos años estuvo limitada a América Latina; sin embargo, con las consecuencias de la globalización, la migración, el desarrollo tecnológico para el trasplante de órganos y tejidos, se han venido presentando casos en países como Estados Unidos y España, alcanzado el continente europeo e incluso se ha extendido a Australia y a algunos países de Asia. Se estima que 20 países de América Latina son endémicos para la enfermedad y la mayoría de personas afectadas residen en zonas rurales de muy difícil acceso geográfico, aunque también existen poblaciones afectadas en centros urbanos a consecuencia de la migración interna. Según estimaciones de la OMS para el año 2010 en la región de las Américas, cerca de 70.199.360 personas están expuestas al parásito y 5.742.167 ya se encuentran infectadas (2,4,36).

En Colombia gran parte del territorio es endémico para la enfermedad de Chagas, desde La Guajira donde las comunidades indígenas tienen las más altas prevalencias del país (47% en adultos infectados en asentamientos indígenas) hasta en la Amazonia donde se han reportado seroprevalencias desde 0,09% en el departamento de Amazonas hasta 2,07% en el Guaviare, únicamente en los departamentos de Quindío y Risaralda la transmisión vectorial no se ha descrito; sin embargo, se ha identificado la presencia del vector en casi la totalidad del territorio nacional (37–40).

En Colombia, se han venido comercializando un gran número de pruebas no convencionales bajo registro INVIMA, según Decreto 3770 de 2004 (41), con características operativas determinadas por los fabricantes en validaciones primarias y de las cuales no se conoce su desempeño diagnóstico en el contexto epidemiológico local, es importante conocer el desempeño de estas pruebas con pacientes que hayan adquirido la infección por *T.cruzi* en regiones colombianas, las cuales sabemos que presentan particularidades en su dinámica de transmisión y una variabilidad genética del mismo parásito.

El desconocimiento del desempeño de las técnicas convencionales y no convencionales (comerciales) en pacientes colombianos, hace que los laboratorios con servicio de diagnóstico inmunoserológico, posiblemente utilicen tecnologías que no alcancen un nivel adecuado de clasificación de los pacientes sospechosos. La utilización de pruebas de tamizaje con una baja sensibilidad captará menor cantidad de pacientes enfermos y dejará sin diagnóstico a muchos pacientes que necesitan un tratamiento etiológico oportuno. Además, teniendo en cuenta que actualmente se realizan modificaciones en el sistema de salud nacional con la implementación de la Política Integral de Atención en Salud (PAIS) (42), junto con el Modelo de Atención Integral en Salud (MAIS) y su operatividad mediante las Rutas de Atención Integral en Salud (RIAS) (43), es necesario conocer las características operativas de las tecnologías diagnósticas de mayor uso en Colombia, con el fin que el Ministerio de Salud cuente con evidencia científica y herramientas técnicas para recomendar, gestionar y adquirir pruebas que permitan la adecuada caracterización de los pacientes con sospecha de ECh dentro de un escenario de vigilancia rutinaria y que den respuesta a las intervenciones colectivas de salud pública del país.

De igual manera, dentro de las metas del Plan Decenal de Salud Pública 2012 – 2021 se encuentra la disminución de la morbilidad de la Enfermedad de Chagas, la cual se espera lograr mediante la interrupción de la transmisión del *T. cruzi* por el *Rhodnius prolixus* intradomiciliado en 121 municipios hasta el año 2021, proceso que tiene como primer paso el levantamiento de línea base serológica en pacientes menores de 15 años con su respectivo tratamiento y seguimiento, seguido de una intervención química en las casas de los municipios seleccionados y un control serológico cada 2 años para evaluar la interrupción de la transmisión vectorial. En caso que se utilicen tecnologías poco sensibles, posiblemente se puede comprometer la detección de casos y se verá afectada la certificación de la interrupción, debido a que algunos infectados que no fueron captados inicialmente, podrían ser identificados posteriormente en el seguimiento de la evaluación (44).

En este orden de ideas, es necesario estimar y conocer las características operativas de estas técnicas comerciales, para poder generar una directriz desde el LNR sobre su uso y directamente sobre la operatividad del lineamiento nacional de diagnóstico serológico de la ECh, el cual a corto plazo podría implementarse sin ninguna limitación en la mayoría de los laboratorios de mediano nivel de complejidad y de referencia a nivel departamental, e inclusive a nivel municipal.

Con estudios de verificación de las características operativas de las técnicas de ELISA, el algoritmo de diagnóstico serológico será más operativo, técnicamente el

ensayo se podría realizar en un número mayor de laboratorios, pues la exigencia de infraestructura e insumos se reduciría considerablemente.

Si la cobertura de la realización de las pruebas diagnósticas aumenta, los pacientes accederán de una forma más fácil a los exámenes diagnósticos en un mismo laboratorio con menos contactos con el sistema de salud, menor costo y por ende, se obtendrán resultados oportunos en tiempos muy cortos que harán que el tratamiento integral tenga así mismo una mayor oportunidad e impacto, evitándose en los pacientes asintomáticos las posibles complicaciones de tipo cardíaco (45).

1.4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el rendimiento diagnóstico de las técnicas de ELISA para la detección de anticuerpos anti-*T.cruzi* comerciales de mayor uso en laboratorios y bancos de sangre en Colombia, frente a las pruebas inmunoserológicas (ELISA e IFI) utilizadas como referencia en el algoritmo serológico para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas por el Instituto Nacional de Salud de Colombia?

1.4.1 Preguntas secundarias

¿Cuál es el rendimiento diagnóstico individual de las técnicas de ELISA para la detección de anticuerpos anti-*T.cruzi* comerciales de mayor uso en laboratorios de salud pública y bancos de sangre en Colombia, frente a las pruebas inmunoserológicas (ELISA e IFI) utilizadas como referencia en el algoritmo serológico para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas por el Instituto Nacional de Salud de Colombia?

¿Cuál es el rendimiento diagnóstico en binomios de las técnicas de ELISA para la detección de anticuerpos anti-*T.cruzi* comerciales de mayor uso en laboratorios de salud pública y bancos de sangre en Colombia, frente a las pruebas inmunoserológicas (ELISA e IFI) utilizadas como referencia en el algoritmo serológico para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas por el Instituto Nacional de Salud de Colombia?

2. MARCO TEORICO

2.1. GENERALIDADES

La Organización Mundial de la Salud (OMS), ha agrupado un número de patologías infecciosas que comparten ciertas características que siempre han sido vinculadas a la pobreza, generalmente proliferan y se mantienen en ambientes tropicales y húmedos, se relacionan con escasa salubridad y poca higiene de las poblaciones, y además la industria farmacéutica no ha tenido el suficiente interés sobre los medicamentos terapéuticos por la falta de demanda, a este grupo de enfermedades se les denomina “Enfermedades Tropicales Desatendidas o Neglected Tropical Diseases” (NTD). La gran mayoría son transmitidas por insectos, como flebotomos, mosquitos y triatominos, algunas por el agua o incluso por el suelo, pero algo que realmente tienen en particular es que atacan a poblaciones que en su mayoría se encuentran en altos índices de pobreza y en condiciones limitadas de saneamiento básico (46).

La enfermedad de Chagas o Trypanosomiasis americana hace parte de este grupo de patologías desatendidas, es una enfermedad producida por un protozoo flagelar (phylum *Sarcomastigofora*, orden *kinetoplastida*, familia *Trypanosomatidae*), llamado *Trypanosoma cruzi*, descrito por primera vez en 1909 por el médico brasileño Carlos Ribeiro Justiniano Chagas en Minas Gerais, Brasil. Esta enfermedad afecta generalmente después de una fase silente, al corazón y al sistema digestivo. Si bien, fue en este año en que la infección en humanos fue descubierta, se han encontrado registros del ADN del *T.cruzi* en momias en Perú y Chile de más de 7000 años de existencia, lo que evidencia que el parásito ha permanecido en América por más de 9000 años (17,45,47).

Las investigaciones desarrolladas posteriormente por el investigador Carlos Chagas y en varios estudios de sus colegas como Salvador Mazza y Cecilio Romaña, se logró determinar que el parásito desarrolla un ciclo de vida en algunos insectos hematófagos y otro en mamíferos, además, no solo se descubrió el agente etiológico sino su comportamiento en vectores, algunos reservorios, mecanismos de transmisión y hallazgos clínicos importantes en los humanos, como el primer caso de Chagas congénito. Consecutivamente se logró comprobar que, a pesar de esto, la transmisión estaba condicionada y estrechamente relacionada con factores ecológicos, socioeconómicos, geográficos, ambientales como altitud, temperatura y humedad y respuesta inmunológica del hospedero, entre otros (17,45,48).

Después del principal hallazgo en zonas de Brasil y con la divulgación del descubrimiento de Carlos Chagas, empezaron paulatinamente a notificarse casos de la presencia del parásito en diferentes países de América Latina, en El Salvador en 1913, Costa Rica 1922, Panamá 1931, Guatemala 1933, Honduras 1960, Nicaragua 1949, entre otros, hasta lo que tenemos hoy en día, 21 países de Latinoamérica con zonas endémicas y no endémicas, dejando a Brasil y Bolivia como los países con más prevalencia e incidencia respectivamente (17).

2.2. MECANISMOS DE TRANSMISIÓN

El insecto hematófago que interviene en la transmisión del parásito, del cual se han descubierto más de 100 especies diferentes, pero menos de diez se han visto fuertemente relacionadas con la transmisión vectorial como el *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *Pastrongilus geniculatus* y *Triatoma infestans*, entre otros, juega un papel importante en la dinámica de la transmisión, debido a que si el vector está infectado con el parásito, sus heces contienen grandes cantidades de trypomastigotes metacíclicos, estadio infectante del parásito, que al entrar en contacto con mucosas, sangre o tejido expuesto del mamífero por cualquier medio, éste será infectado. En la transmisión vectorial, es común que el triatomo hematófago se acerque al humano o reservorio con el objetivo de alimentarse de su sangre, posterior a la ingesta y como reflejo, el insecto eyecta sus heces, las cuales pueden llegar a tener contacto con el orificio por donde se alimentó y por ende los parásitos pueden ingresar al torrente sanguíneo (17,45,49).

Según diferentes autores, no todas las especies de triatominos tienen la misma capacidad vectorial, es decir, algunas especies facilitan la transmisión y la metaciclogénesis de algunos linajes específicos de *T.cruzi*, por tal motivo la transmisión vectorial es uno de los procesos ecológicos más estudiados actualmente. Sin embargo, como la mayoría de las patologías zoonóticas, el humano es un reservorio accidental que no debería estar presente en la ecología del entorno, aun así, con la consecuente y acelerada incursión del hombre a entornos rurales y selváticos, este se ha visto altamente comprometido y afectado por el *T.cruzi* (39,49).

Aunque la transmisión vectorial es la más frecuente y la que ha dejado más víctimas después de su descubrimiento, también existen mecanismos de transmisión no vectoriales, que se hacen importantes en zonas urbanas y en países desarrollados. Otra forma de transmisión es la congénita, donde es posible que las mujeres gestantes con la infección lleguen a transmitir el parásito a su bebé; sin embargo,

no se conoce exactamente qué factores favorecen este comportamiento, ni la probabilidad de transmisión congénita de una madre seropositiva, hay registros de tasas desde el 1% al 8% de transmisión congénita en países con menor y mayor incidencia de la enfermedad respectivamente (24,50).

La tercera vía de transmisión es por medio de transfusión de sangre/hemoderivados o trasplante de órganos y tejidos, pero actualmente gracias a los programas de tamizaje y pesquisa que existen en los bancos de sangre y tejidos, la frecuencia de transmisión por este medio ha disminuido drásticamente; no obstante, debido al proceso físico de separación de componentes sanguíneos existe mayor riesgo en la transfusión de plaquetas (51). Otro medio de transmisión, infrecuente pero posible y con reportes científicos, es por medio de accidentes de laboratorio o relacionados con la práctica clínica (49).

En países como Brasil, Venezuela y Colombia, existe en común la transmisión oral, mecanismo que ha tomado gran interés por las entidades sanitarias, la contaminación oral se debe frecuentemente al mal almacenamiento y tratamiento de los víveres, los vectores y los reservorios contaminan con sus heces y fluidos las frutas o alimentos con los que posteriormente se elaboran jugos o comidas. Esta forma de transmisión ha dejado víctimas fatales en zonas endémicas, como se ha documentado a partir del año 1999 en Colombia donde se presentaron 13 casos, 5 de ellos fatales en Guamal (Magdalena), hasta la fecha donde la morbilidad sigue siendo notificada (37,52).

2.3. EPIDEMIOLOGÍA

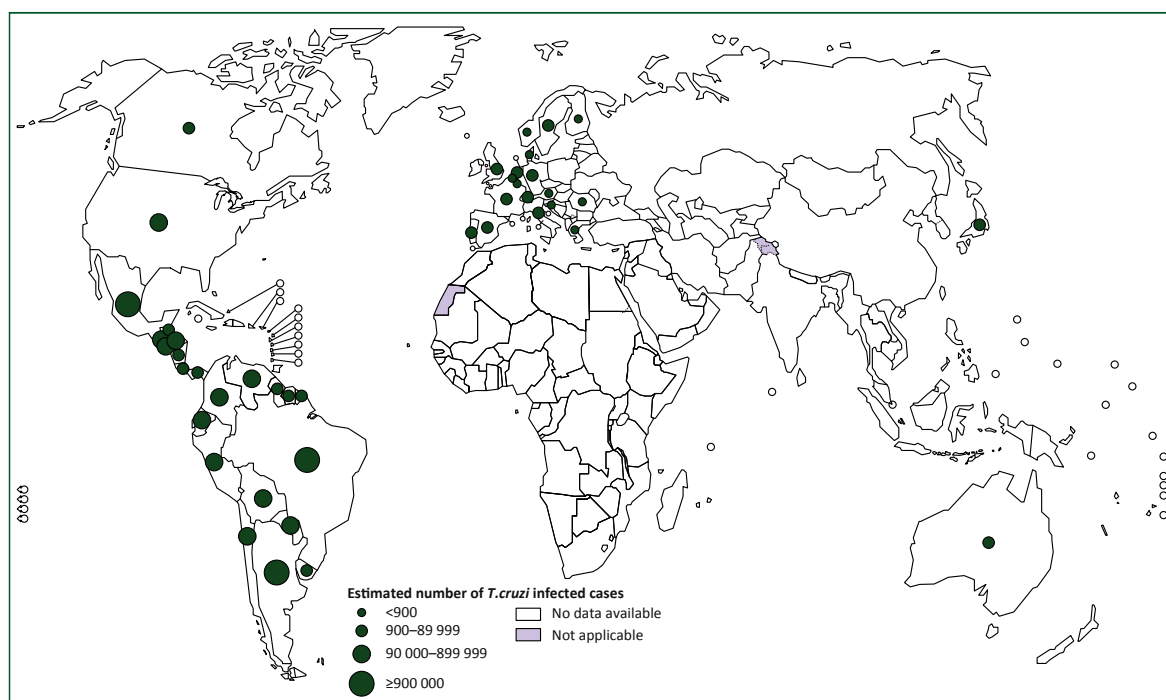
“Como consecuencia de los flujos migratorios, el Chagas ha dejado de ser un problema exclusivo de Latinoamérica y ahora se encuentra presente en países no endémicos. Se estima que hay alrededor de 300.000 personas infectadas en EEUU y 150.000 en Europa” ISGlobal (53).

La enfermedad de Chagas es una patología tropical, con una dinámica de transmisión compleja ya que relaciona muchas especies de vectores y reservorios, endémica en la mayoría de los países de América Latina, hasta hace pocos años se pensaba que la enfermedad estaba limitada a este continente; sin embargo, gracias a la facilidad de los desplazamientos y a la globalización, se han registrado casos importados en Estados Unidos, Europa y Australia, entre otros (45,50).

Entidades gubernamentales y no gubernamentales de todo el mundo, han realizado estudios acerca de la carga de la enfermedad de Chagas, no solo en los países endémicos, sí no también en los no endémicos, se ha evidenciado que la frecuencia de infección aumenta considerablemente en países como Estados Unidos, Canadá, Australia, Japón, Francia, Suiza, Inglaterra y España (Figura 1) (45,50).

El Instituto de Salud Global de Barcelona (ISGlobal) en 2015, consolidó información acerca de la carga de latinoamericanos infectados con Chagas residentes en Europa, evidenciando que, a pesar de la poca cantidad de estudios dirigidos a la búsqueda de la proporción real de la enfermedad y su alta heterogeneidad ($I^2=97\%$), la prevalencia en el continente europeo fue de 4.2% (95%IC: 2,2%-6,7%), donde los inmigrantes bolivianos aportaron el 18,1% de los casos (54). Cifras importantes al momento de evaluar las tecnologías de tamizaje en los bancos de sangre y en los programas de vigilancia materna.

Figura 1. Distribución global de Enfermedad de Chagas



NOTA: basado en estimaciones oficiales 2006 a 2010

Fuente: Tomado sin modificaciones de Pinto Dias JC. *Evolution of Chagas Diseases Screening Programs and control Programs*. Global Heart. 2015. (45)

La OMS estima que, basados en datos del 2015, 5.742.167 personas, están infectadas con *T.cruzi* en 21 países de América Latina, de las cuales el 62,4% se encuentran en países del cono sur (Brasil, Argentina, Uruguay, entre otros). Argentina, Brasil, México y Bolivia son los países con más casos reportados. En la región Andina, se encuentran 958.453 personas infectadas, aproximadamente el 45,7% (n=437.960) de ellos procedentes de Colombia. Países como Chile, Paraguay, Venezuela, Perú y Guatemala tienen entre 100.000 y 200.000 casos (55).

En relación a la transmisión vectorial, esta suele ser más frecuente en Bolivia, se registran 8.087 casos nuevos, seguido de México (n=6.135) y Colombia (n=5.274). Argentina y Bolivia aportan cerca del 30,62% de casos nuevos al año de toda Latinoamérica. Para la transmisión congénita, según estimaciones de estos mismos datos Paraguay, Ecuador, Bolivia, Argentina y Colombia presentan respectivamente las tasas más altas de transmisión congénita, sin embargo, en Colombia aún en los estudios de este tipo de transmisión, falta una exploración mayor (55).

Colombia tiene las cifras más alarmantes en población general de la región Andina después de Bolivia, aunque es importante tener en cuenta que la población de Colombia es 4.6 veces la población de Bolivia. Se estima que, en Colombia el número estimado de nuevos casos por año por transmisión vectorial oscila en 5.274, además, 166.221 mujeres en edad fértil (15 a 44 años) se encuentran infectadas con el parásito, para lo cual se calculan 1.046 casos nuevos anuales por transmisión congénita, dejando una tasa de 0,114 infectados por cada 100 nacidos vivos. De igual manera, 131.388 personas pueden padecer cardiopatía chagásica (55).

El sistema de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) del INS en Colombia, para la semana 52 del año 2016 registró 927 casos de la enfermedad, 37 de ellos diagnosticados en fase aguda con tan solo 12 confirmaciones por laboratorio, 890 en fase crónica con 454 casos confirmados por laboratorio. Según estas estimaciones y lo observado por el sistema de vigilancia, se confirman menos del 10% de los casos en Colombia, teniendo en cuenta la limitación que existe para el tratamiento menos del 1% de los pacientes llegan a ser tratados oportunamente (Tabla 1) (37).

El SIVIGILA, cuenta con dificultades inherentes a la recolección de la información, en Colombia el subregistro de los casos toma un importante papel debido a que no todos los casos agudos y crónicos son notificados al sistema, a pesar de ello, el Laboratorio Nacional de Referencia del INS, cuenta con un sistema de vigilancia por laboratorio que muestra que durante el año 2016 fueron diagnosticados mediante

dos técnicas de principio diferente, según lineamiento de OMS, 709 pacientes, con una positividad de 25,11% (n=178), la mayoría de ellos en un rango de edad de 46 a 59 años. Sin embargo, se debe destacar que la prestación del servicio de diagnóstico se realiza, a pesar de la existencia de la barrera que existe con este evento a nivel de los prestadores (56).

Tabla 1. Casos de Enfermedad de Chagas en fase crónica a 2016 por entidad territorial notificadora en Colombia

Entidad Territorial	Probables	Confirmados	Total	%
Casanare	99	128	227	25,5
Santander	80	139	219	24,6
Boyacá	104	53	157	17,6
Tolima	42	12	54	6,2
Arauca	16	24	40	4,6
Cesar	20	20	40	4,6
Norte de Santander	5	29	34	3,9
Bogotá	13	13	26	2,9
Cundinamarca	15	10	25	2,8
Meta	11	6	17	1,9
Antioquia	5	3	8	0,9
Guaviare	0	7	7	0,8
Bolívar	5	0	5	0,6
Caquetá	1	3	4	0,4
Huila	2	2	4	0,4
Sucre	4	0	4	0,4
Barranquilla	2	0	2	0,2
Caldas	0	2	2	0,2
Cartagena	1	1	2	0,2
Choco	2	0	2	0,2
Córdoba	2	0	2	0,2
Exterior	2	0	2	0,2
Valle	1	1	2	0,2
Cauca	1	0	1	0,1
La Guajira	0	1	1	0,1
Quindío	1	0	1	0,1
Santa Marta	1	0	1	0,1
Vichada	1	0	1	0,1
Total	436	454	890	100

%; porcentaje en el total en Colombia.

Fuente: Instituto Nacional de Salud. Boletín Epidemiológico semanal. Vol 52. BES INS. 2016 (37)

Desde el descubrimiento de la enfermedad en Brasil, los períodos epidemiológicos y la epidemiología molecular del parásito han sufrido bastantes modificaciones, gracias al conocimiento que actualmente se tiene sobre la enfermedad se han logrado significativos avances en su control y en su entendimiento. A pesar que esta patología se encuentra en los objetivos del milenio, aún siguen siendo muchas las metas a cumplir en relación a la transmisión de la enfermedad; sin embargo, es

importante tener en cuenta que no solo el conocimiento de su distribución es importante, sino, además como y donde se realizan los respectivos diagnósticos y tratamientos. Es así, como existen varias limitaciones que han impedido la disminución de la mortalidad y la morbilidad por esta patología, entre otros, factores como la limitación en el diagnóstico en algunas regiones endémicas, así como la falta de oportunidad en el tratamiento que, aunque es una enfermedad tratable, los pacientes lo desconocen y cuando logran una atención médica después de un diagnóstico, necesitan de varios contactos con los médicos para evaluar su posible adherencia y seguimiento al tratamiento (6,17,45).

El costo anual de la carga de la enfermedad de Chagas, está alrededor de 7.200 millones de dólares y tan solo 162 millones son destinados a investigación y desarrollo, dejando serios problemas en acceso al diagnóstico y tratamiento, evidenciando limitaciones como, falta de formación en el personal de salud, falta de estrategias de atención primaria en salud, pocas tecnologías precisas para el diagnóstico, herramientas para la pesquisa rápida y falta de medicamentos eficaces en edades adultas de los pacientes, entre otros (53).

2.4. FASES CLÍNICAS

La ECh tiene dos fases clínicamente diferenciadas, una fase aguda y una fase crónica. El periodo de incubación generalmente puede variar entre una a cuatro semanas después de la exposición al parásito, sin embargo, hay evidencia que sugiere que este periodo está condicionado a la vía de transmisión, así, casos de transmisión oral tienen menos días de incubación y casos de transmisión por transfusión de sangre u trasplante de órganos han llegado hasta cuatro semanas de incubación (2,14).

Los síntomas de la fase aguda no son específicos de la enfermedad, van desde una leve fiebre, malestar general y hepatoesplenomegalia hasta fiebre prolongada, alteraciones en el cuadro hemático y nódulos linfáticos en hígado o bazo. Esta fase puede durar entre una a tres semanas. En casos de transmisión vectorial se encuentran signos de entrada del parásito, si es por piel se encuentra una zona caracterizada por endurecimiento, eritema e hinchazón, llamada “Chagoma”, mientras que, si la entrada es por la mucosa ocular, se produce una inflamación indolora bipalpebral y de tejidos perioculares generalmente unilateral, llamado signo de “Romaña”. La mayoría de las infecciones agudas no son detectadas debido a la inespecificidad de estos síntomas y menos del 1% de estos pacientes pueden llegar a ser mortales debido a casos graves de encefalitis y miocarditis (2,17). Uno de los

hallazgos más comunes en esta fase de la enfermedad, es la constante parasitemia que presenta el paciente, de tal forma, los métodos diagnósticos a elegir, idealmente son los parasitológicos, como la observación directa del parásito en preparaciones en fresco o coloraciones microscópicas, detección del ADN del parásito por técnicas de biología molecular (PCR) o por cultivo de sangre periférica (2,51).

Es común que las personas infectadas puedan sobrevivir a esta fase de la enfermedad, este proceso es el resultado de una combinación entre la respuesta inmune mediada por células y la virulencia y características genéticas de la cepa de *T.cruzi*, es así, como seguido de esta fase al cabo de dos a tres meses el paciente inicia una fase crónica de la enfermedad. Para este momento generalmente los síntomas desaparecen y la parasitemia que caracteriza la fase aguda disminuye considerablemente (2,6).

Se estima que cerca del 20% al 30% de los pacientes en fase crónica pueden avanzar a una fase determinada, es decir, evidencian algún tipo de daño cardíaco, digestivo (principalmente mega-esófago o mega-colon) o cardio-digestivo después de 10 a 30 años post infección. El 70% u 80% restante progresan a una forma indeterminada o sin manifestaciones clínicas o asintomática por el resto de su vida, aunque presentan anticuerpos de tipo IgG anti-*T.cruzi*, electrocardiograma (ECG) normal y exploraciones radiológicas normales (Figura 2) (2,6,51). En el estudio de Sabino et al, se estimó que la tasa de progresión a cardiopatía en pacientes infectados con *T.cruzi* fue de 1.85% por año (57).

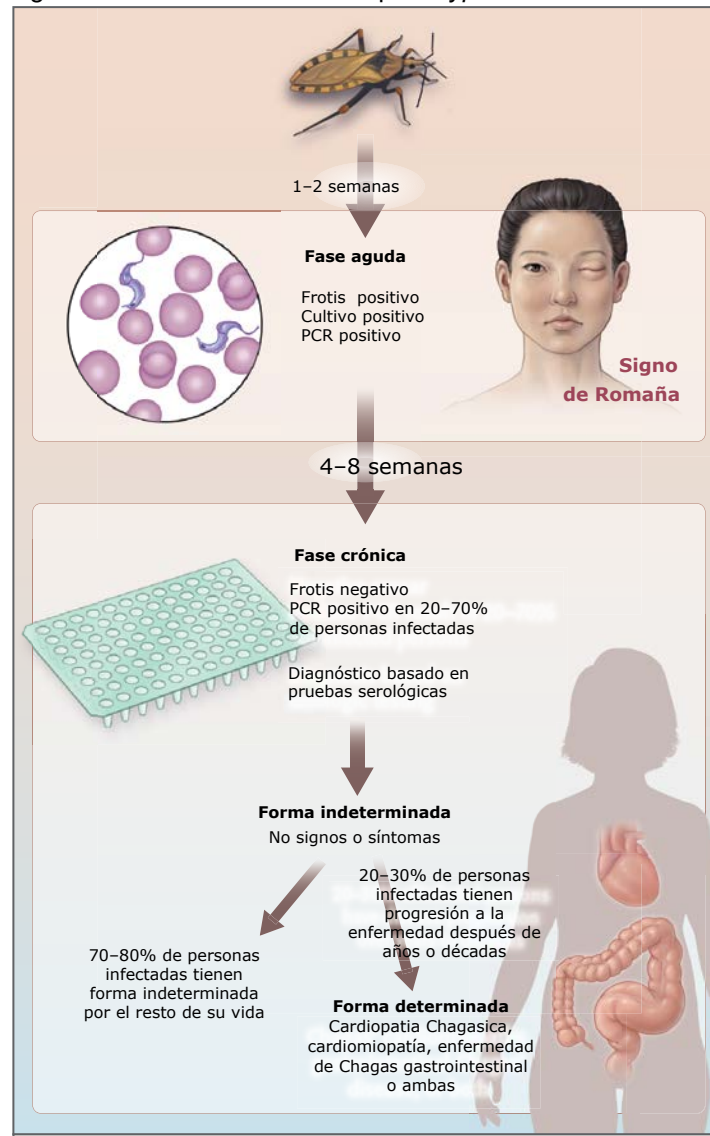
Los pacientes en fase crónica pueden presentar reactivación, que sucede cuando el sistema inmunitario puede comprometerse por alguna razón, ya sean enfermedades autoinmunes o procesos de medicación para trasplantes de órganos, e iniciar un proceso de parasitemia activa, de tal manera los pacientes cursan nuevamente una fase aguda con el mismo riesgo de presentar manifestaciones clínicas que ameritarían nuevamente un manejo integral (14).

2.4. VARIABILIDAD GENÉTICA

Como es bien reconocido actualmente, la infección por *T.cruzi* es un proceso estudiado bajo los campos de la biológica molecular y la biotecnología, este parásito posee una variabilidad genética importante, relacionada directamente con el desarrollo de este en el vector, en el reservorio, con la ecología de la transmisión, la patogénesis, la afinidad celular que presenta y la distribución geográfica, incluso con la respuesta inmunológica de los humanos. Gracias a los avances tecnológicos

y a la biología molecular, se han logrado realizar diferentes estudios con marcadores moleculares que han ayudado a evidenciar la cercanía filogenética que tienen las diferentes cepas de *T. cruzi* en general, de esta manera se logran identificar las Unidades Discretas de Tipificación (DTU), agrupaciones de cepas genéticamente cercanas y que comparten algunas características moleculares (20,21).

Figura 2. Fases de la infección por *Trypanosoma cruzi*



Fuente: Traducido al español y tomado de Bern C, Longo DL. *Chagas' Disease*. New England Journal Medicine. 2015 (2)

Actualmente, existen seis DTU bien reconocidas (TcI a TcVI) y algunas como la TcBAT, que está más cerca de la TcI, pero claramente separada de los otros DTU. TcI y TcII son los grupos más distantes genéticamente, pero TcI es el grupo de las

DTU más abundante y heterogéneo de toda las DTU. Estas DTU difieren unas de otras además en cuanto a distribución geográfica y patogénesis en relación a manifestaciones clínicas del paciente, dinámica de transmisión, entre otros. Así, en los países del cono sur, predomina la TcII y en el norte de Suramérica y en la mayor parte de Centro América predomina TcI. Las DTU también difieren en la ecología de la transmisión, es decir, TcI circula en ciclos selváticos y domésticos, mientras TcII principalmente está asociado con ciclos domésticos. Asimismo, formas de transmisión como la congénita está asociada a todas las DTU excepto con TcIV y el daño cardíaco se asocia principalmente a TcI, mientras que el daño digestivo se asocia a TcII, TcV y TcIV (20,21,58).

2.5. DIAGNÓSTICO

Casi como en cualquier enfermedad infecciosa, el diagnóstico de la ECh debe ser un proceso integral entre el análisis de las manifestaciones clínicas, variables epidemiológicas y la confirmación mediante pruebas de laboratorio, si este último no se ejecuta adecuadamente, podría administrarse tratamiento a alguien quien no lo necesite y de esta forma enmascarar otras patologías o exponerlo a los posibles efectos adversos del medicamento, incluso peor aún, no aplicar tratamiento al paciente que verdaderamente lo necesite. El papel del diagnóstico por laboratorio ha tomado gran importancia debido a la evolución silente de la enfermedad, pues en este periodo únicamente la infección puede ser evidenciada por la presencia de anticuerpos específicos contra el *T.cruzi* (2,50).

El diagnóstico de la enfermedad se puede realizar de dos formas, uno, observando directamente el parásito en sangre o ADN del mismo y dos, mediante la búsqueda de la respuesta inmune del hospedero frente al *T.cruzi*, es decir la detección de anticuerpos específicos. De allí, que el método de elección diagnóstico, está en función de la fase de la infección que se sospeche (6).

En la fase aguda y en los casos de infección congénita, gracias al aumento de la parasitemia los métodos priorizados deben ser los parasitológicos, directos como el análisis microscópico de sangre en fresco, los métodos de concentración como el micrométodo o el método de Strout o los métodos de tinciones de sangre periférica en extendido o en gota gruesa con Giemsa, aunque estos últimos muestran una menor sensibilidad. También es utilizado el cultivo de sangre periférica, aunque necesita gran cantidad de recursos y los resultados se obtienen después de mucho tiempo, es ideal para estudios de investigación clínica. Resultados negativos en los análisis parasitológicos no descartan la infección, pero los hallazgos de formas

parasitarias si la confirman (6,17). Teniendo en cuenta que, en la fase crónica, la parasitemia disminuye drásticamente y la expresión de anticuerpos de tipo IgG aumenta progresivamente con el tiempo, el método de selección para el diagnóstico en esta fase es la búsqueda de anticuerpos específicos del hospedero frente al *T. cruzi*. Para su detección, existen diferentes métodos que, si bien todos buscan la presencia de anticuerpos en las muestras de suero o plasma, pueden diferir en la forma como evidencian la reacción y la unión entre el antígeno con el anticuerpo (2,6,17).

La detección de anticuerpos de tipo IgM en fase aguda, no se ha recomendado durante muchos años, debido a que esta molécula puede tener reactividad cruzada con moléculas expresadas cotidianamente y mostrar resultados falsos positivos, es decir, puede reaccionar por una respuesta inmunitaria frente a alguna virosis, patologías autoinmunes, incluso frente a presencia del factor reumatoide en altas concentraciones. Estudios también han demostrado que las IgM, pueden permanecer por más tiempo en algunos pacientes, lo cual no sería de utilidad en la búsqueda de la infección en fase aguda (17).

Existen diferentes métodos de diagnóstico serológico, desde sus inicios se han utilizado técnicas como la fijación del complemento conocida como la prueba de Machado-Guerreiro, además del xenodiagnóstico, fijación y precipitación de partículas, entre otros. Sin embargo, después de los años 50s se generalizó el uso de la Hemaglutinación Indirecta (HAI) y la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), hasta llegar en los años 70s a la utilización de la técnica de *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) que actualmente es la de mayor uso (17).

La técnica de ELISA es un ensayo que se utilizó por primera vez para detectar anticuerpos de pacientes con Enfermedad de Chagas por Voller en 1975, desde entonces su uso se ha vuelto bastante generalizado, debido a que es una técnica sencilla, no requiere gran cantidad de recursos ni reactivos y además elimina la subjetividad de otros métodos gracias a la lectura de la reacción por medio de un espectrofotómetro mediante la variación del color (59).

Los métodos serológicos para el diagnóstico de la ECh se dividen en métodos convencionales y no convencionales, de acuerdo al principio antigénico que utilicen para la detección de los anticuerpos. Los métodos convencionales son aquellas pruebas que utilizan una mezcla de antígenos totales, crudos o lisados del parásito, generalmente del estadio de epimastigotes, los cuales son obtenidos en cultivo "*in vitro*", tradicionalmente estas técnicas son desarrolladas y ensambladas por

laboratorios de investigación basados en cepas y linajes de *T.cruzi* locales y regionales (6,17).

Los métodos no convencionales utilizan antígenos específicos procesados por tecnología de ADN recombinante, reconociendo en la cadena de ADN del parásito secuencias que codifican antígenos altamente conservados en los diferentes linajes de *T.cruzi* y cuáles de ellos estimulan una mayor respuesta inmunológica. Estos antígenos son expuestos en fases sólidas y así buscan reconocer anticuerpos específicos que reaccionen a estas proteínas (60,61).

Las metodologías convencionales fueron las primeras tecnologías desarrolladas y utilizadas por los diferentes laboratorios de referencia como herramienta para el diagnóstico de la ECh, sin embargo, con el paso del tiempo y a medida que se fue obteniendo más información sobre la respuesta inmunológica de los pacientes, fue necesario que la comunidad científica accediera más fácilmente a estas tecnologías, fue así como hacia los 80s se empezaron a comercializar estuches de pruebas con un rendimiento mejorado.

Las técnicas de ELISA convencionales han ofrecido desde sus inicios una adecuada sensibilidad en los ensayos, esto viene siendo beneficioso para los bancos de sangre y los laboratorios de tamizaje; sin embargo, estas metodologías carecían de una adecuada especificidad, la cual era completamente necesaria para ofrecer tratamiento etiológico a los pacientes con la sospecha de la enfermedad. Fue de esta manera como nació la necesidad de estudiar diferentes antígenos purificados y recombinantes, para poder ofrecer herramientas diagnósticas que además de contar con buena sensibilidad tuvieran una adecuada especificidad(1).

La ELISA configurada con extractos totales posee la desventaja de hacer reacción cruzada con otro tipo de agentes infecciosos, es decir, obtener un resultado positivo debido a la reacción con un agente diferente al *T.cruzi*. Varias especies de otros parásitos, incluso especies de la familia *Trypanosomatidae* comparten algunos antígenos estructurales con el *T.cruzi*, que son reconocidos por los anticuerpos de tipo IgG.

A pesar de estos hallazgos, es solo con el *T.rangeli* que comparte distribución geográfica, enmascarándose simultáneamente la infección. En relación a la reacción cruzada con *T.rangeli*, existen diferentes estudios en los cuales los resultados son bastante heterogéneos, algunos indican que los anticuerpos contra el *T.rangeli*, pueden ser reconocidos por algunas técnicas diagnósticas para *T.cruzi*,



otros indican que algunas subespecies de *T.rangeli*, no generan reacciones cruzadas con metodologías para detección de *T.cruzi*, y otros han llegado a evidenciar que la infección mixta entre *T.cruzi* y *T.rangeli*, puede generar cierto tipo de protección o beneficio clínico para el paciente. Este fenómeno también ocurre con varias especies de *Leishmania sp.*, agente etiológico de la Leishmaniasis (cutánea, mucocutánea y visceral) produciendo en algunos casos falsos positivos. Gracias a estas evidencias, la OMS empezó a pensar en la utilización de más de una prueba para el diagnóstico confirmatorio de la infección por *T.cruzi* (1,6,17).

Con el objetivo de reducir estas reacciones cruzadas, las cuales según estudian podrían llegar incluso al 10% (6) y de obtener pruebas con mejor especificidad, las técnicas no convencionales que son fabricadas con antígenos recombinantes, empezaron a tomar fuerza en la comercialización de nuevos productos de apoyo diagnóstico. En las primeras investigaciones de los posibles antígenos recombinantes con utilidad diagnóstica, Moncayo A. y Luquetti A. en 1990, encontraron que la selección de un único antígeno recombinante no mostraba los resultados esperados en relación a sensibilidad, probablemente debido a que como se restringía el número de antígenos, algunos pacientes podrían no tener anticuerpos contra ese antígeno específicamente, mientras que la mezcla y utilización de varios antígenos recombinantes, incluso con péptidos sintéticos evidenciaba un mejor resultado (61).

Adicionalmente, a la tecnología de antígenos recombinantes, se presentaron los péptidos sintéticos, los cuales son cadenas de aminoácidos mucho más cortas, pero que igualmente pueden aun ser más específicos que los extractos totales, de igual manera pequeñas cantidades de péptidos muestran menor rendimiento que una mezcla de varios de ellos en términos de sensibilidad (60).

De esta manera varios autores han demostrado con sueros de pacientes infectados con *T.cruzi*, cuales son las fracciones antigénicas (Tabla 2) y que mezclas de antígenos muestran un mejor comportamiento a la hora de utilizarlos en el diagnóstico (Tabla 3). La elección de los antígenos con las cuales se configuran las técnicas garantiza el resultado, tanto como el procedimiento óptimo con que éstas se realizan (60).

Otra de las técnicas utilizadas más recientemente es el inmunoensayo quimioluminiscente (CLIA) por sus siglas en inglés, el cual se basa en el uso de micropartículas sensibilizadas con antígenos recombinantes de *T.cruzi*, los cuales reaccionan con anticuerpos, reacción que es evidenciada mediante una

antigamaglobulina y detectada a través de una unidad relativa de luz

Para el diagnóstico de la enfermedad y la utilización de estas diferentes metodologías es importante tener en cuenta varias consideraciones:

- a) Las fracciones antigénicas recombinantes utilizadas deben estar presentes solo en especies de *T. cruzi*, deben ser constantes en las diferentes DTU's y deben estimular fuertemente la respuesta antigénica.

Tabla 2. Proteínas recombinantes y péptidos sintéticos de *T. cruzi* con uso potencial clínico y epidemiológico.

Antígeno ^a	Longitud repetida (aminoácidos)	Proteína nativa ^b (kDa)	Marcadores	Uso/ diagnóstico	Referencias
CRA	14	225	Antígeno citoplasmático	Infección crónica	6
Ag30		180–225			6
JL8		>170			6
TCR27		150–200			6
FRA	68	>300	Proteína asociada al citoesqueleto	Infección crónica	6
Ag1		205			6
JL7		>170			6
H49		>300			8
B13	12	116–140	Proteína de superficie del <i>Trypanosoma</i>	Infección crónica	9
Ag2		85			6
TCR39		82			6
PEP-2					10
Ag36	38	85	Proteína asociada a microtúbulo	Infección aguda y crónica	6
JL9		110			6
MAP					6
SAPA	12	105–205	Trans-sialidasas (Familia TS)	Infección aguda y crónica	6
TCNA					6
TS					6
Ag13	5	85		Infección aguda y crónica	6
TcD		260			11
B12	20	200–230		Infección crónica	9
TcE	7	35	Proteína ribosomal	Infección crónica	12
JL5	Ninguna	38	Proteína ribosomal P	Formas clínicas cardíacas	6
A13	Ninguna	230		Infección aguda y crónica	6
FCaBP	Ninguna	24	Proteína flagelar Ca ²⁺ de unión	Infección crónica - monitorio de cura	6
1F8		24			6
Tc-24		24			13
Tc-28		28			14
Tc-40	Ninguna	38–100		Infección crónica	15
cy-hsp70	Ninguna	70	Proteínas de choque termico	Infección crónica - monitorio de cura	6,16
mt-hsp70		70			16
grp-hsp78		78			16
FL-160	Ninguna	160	Flagellum-associated surface protein (Familia TS)	Infección crónica - monitorio de cura	17
CEA					18
CRP					19
SA85-1.1	Ninguna	85	Proteína de superficie del <i>Trypanosoma</i> (Familia TS)	Infección crónica	17
Ubiquitin	Ninguna			Infección crónica	20

Abreviaturas por su nombre en inglés: CEA, chronic exoantigen of 160 kDa; CRA, cytoplasmic repetitive antigen; CRP, complement regulatory protein of 160 kDa; cy-hsp70, cytoplasmic heat shock protein of 70 kDa; FCaBP, flagellar Ca²⁺-binding protein; FL-160, flagellar surface protein of 160 kDa; FRA, flagellar repetitive antigen; grp-hsp78, endoplasmic reticulum heat shock protein of 78 kDa; MAP, microtubule associated protein; mt-hsp70, mitochondrion heat shock protein of 70 kDa; SAPA, shed acute-phase antigen; SA85-1.1, surface protein of 85 kDa; TCNA, *Trypanosoma cruzi* neuraminidase; TS, trans-sialidase. a Varios nombres diferentes fueron dados a péptidos idénticos o similares y se agrupan juntos. b Los tamaños de algunas proteínas nativas pueden diferir entre diferentes cepas o aislamientos de *T. cruzi*.

Fuente: Traducido al español y tomado de Da Silveira JF. *Chagas disease: Recombinant Trypanosoma cruzi antigens for serological diagnosis*. Trends in Parasitology. 2001. (60)

Tabla 3. Rendimiento diagnóstico de ensayos serológicos usando diferentes combinaciones de proteínas recombinantes o péptidos sintéticos de *T. cruzi*.

Antígenos ^a	Ensayo	Tipo de antígeno	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Refs
CRA+FRA mezcla	ELISA	Proteína de fusión (β-galactosidase)	100.0	100.0	24,25
			98.3	100.0	26
Ag1+Ag2+Ag30+SAPA mezcla	Inmunoensayo enzimático	Proteína de fusión (glutathione-S-transferase)	99.6	99.1	27
	(inmunodot) ^b				
FCaBP+hsp70 mezcla	ELISA	Proteína de fusión (His ₆ -tagged peptide)	97.0	92.3	16
(CRA+FRA+Tc-24+SAPA+MAP+TcD+Ag39) ^c	Line inmunoensayo ^d	Proteínas recombinantes y péptidos sintéticos	100.0 99.4	99.3	28
				98.1	29
TcD+PEP-2 mezcla	ELISA	Péptidos sintéticos	99.7	99.0	34
TcD+Ag2+TcE mezcla	Inmunoensayo en gel de partícula ^e	Péptidos sintéticos	96.8	94.6	35
TcD+TcE+PEP-2 multi-epitope	ELISA	Péptido sintético lineal	99.6	99.3	12
			100.0	100.0	36
TcD+TcE+PEP-2+TcLo1.2 multi-epitope	ELISA	Tetrapéptido sintético ramificado	100.0	ND	12
			100.0	93.3	37
TcD+TcE+PEP-2+TcLo1.2 multi-epitope TcD+TcE	ELISA	Péptido sintético lineal	100.0	ND	12
+PEP-2+TcLo1.2 multi-epitope	ELISA	Proteína de fusión lineal(His-tagged peptide)	100.0	ND	12
			100.0	96.6	37

^aAbreviaturas por su nombre en inglés: CRA, cytoplasmic repetitive antigen; FCaBP, flagellar Ca²⁺-binding protein; FRA, flagellar repetitive antigen; hsp70, heat shock protein of 70 kDa; SAPA, shed acute-phase antigen; ND, no determinado.

^bInmunoensayo enzimático (EIA), Dia KitTM Bio-Chagas assay®, Gador S.A., Argentina.

^cProteínas recombinantes o péptidos sintéticos se fijan individualmente en una sola tira

^dLine Inmunoensayo(LIA) anticuerpos anti-Chagas, Innogenetics, Belgium.

^eInmunoensayo de partícula en gel (PaGIA), DiaMed AG, Switzerland.

Fuente: Traducido al español y tomado de Da Silveira JF. Chagas disease: Recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. Trends in Parasitology. 2001. (60)

- b) El origen geográfico del parásito con el cual se configura la ELISA puede tener relación con su rendimiento diagnóstico, en varios estudios se ha observado la utilización de cepas DTU TcII para el diagnóstico de la enfermedad en pacientes expuestos a TcI, en algunos casos, la respuesta inmunológica se evidencia sin inconvenientes probablemente por la utilización de antígenos crudos, aunque en otras ocasiones se ha evidenciado que los pacientes que se han expuesto a TcI predominantemente, pueden mostrar menos títulos con reactivos configurados con antígenos TcII, generalmente con la utilización de antígenos recombinantes. Por tanto, la disminución de la sensibilidad en las pruebas diagnósticas puede no deberse a la diferencia genética de las DTU utilizadas, si no a la respuesta inmunológica del paciente (17,62).
- c) La inadecuada elección de antígenos recombinantes, puede hacer que los pacientes a quien se les aplica la prueba diagnóstica no tengan anticuerpos contra esa fracción antigénica específica y de esta manera no ser evidente la infección. Por tal motivo, se cree que las pruebas de antígenos totales pueden tener una mayor sensibilidad, porque estos extractos tienen más probabilidad de presentar fracciones antigénicas a las cuales el suero del paciente si tenga anticuerpos (60).



- d) Las preparaciones crudas generalmente son extraídas de epimastigotes de *T.cruzi*, estadio presente en el vector o en cultivos “*in vitro*” del parásito, indicando que las placas de las pruebas solo están sensibilizadas con antígenos expuestos en este estadio. Estudios han evidenciado que antígenos como el SAPA (*Shed Acute Phase Antigen*), se excreta en mayor cantidad en la fase aguda de la infección, por tanto, la utilización de este tipo de antígenos de expresión limitada puede no ser una herramienta útil en el diagnóstico, durante la fase crónica (63).

2.6. TRATAMIENTO

La enfermedad de Chagas, tiene únicamente dos medicamentos tripanocidas, el Benznidazol y el Nifurtimox, cada uno con ciertas características químicas, cinéticas y de actuación frente al parásito, si bien pueden contrarrestar adecuadamente la parasitemia, se han demostrado que ambos medicamentos pueden ocasionar eventos adversos que van desde leves, como malestar general, anorexia y dermatitis, hasta eventos graves como supresión de la médula ósea, parestesias, neuropatías y neuritis periférica (64,65).

Sin embargo, se ha evidenciado que en etapas tempranas de edad del paciente es menos la frecuencia de los eventos adversos, así, los niños que nacen con infección de madres seropositivas o pacientes menores de 5 años, responden eficazmente al tratamiento y con muy pocos eventos adversos (12,51).

De este mismo modo, en los pacientes que presenten daño cardíaco o digestivo ya establecido, la efectividad del medicamento se ve comprometido debido a que el parásito ya altera la funcionalidad de los órganos, pero en algunos casos se han demostrado que puede ralentizar el curso de la cardiopatía o megacolon (66).

La administración del medicamento, es un proceso que debe estar siempre monitoreado por personal médico, anterior a esta deben realizarse pruebas de laboratorio dirigidas al análisis de la función hepática y renal, debe ser únicamente administrado bajo criterio médico y vigilancia del mismo, en casos especiales y se espera que en menos del 10% de los diagnosticados sea manejado por especialistas en cardiología o medicina interna (12).

3. HIPOTESIS

Las características operativas de las técnicas de ELISA (convencionales y no convencionales) comerciales utilizadas para la detección de anticuerpos anti-*T.cruzi* para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en los laboratorios y bancos de sangre en Colombia, no son inferiores a las características operativas de las técnicas inmunoserológicas (ELISA e IFI) utilizadas actualmente como referencia por el Instituto Nacional de Salud en Colombia.

Hipótesis de no inferioridad para la proporción de sensibilidad y especificidad:

$$H_0 = \begin{aligned} Se_i &< 92,5\% \\ Sp_i &< 93\% \end{aligned}$$

$$H_a = \begin{aligned} Se_i &\geq 92,5\% \\ Sp_i &\geq 93\% \end{aligned}$$

Donde Se_i es sensibilidad de la prueba evaluada y Sp_i es la especificidad de la prueba evaluada. Los valores de 92,5% y 93% están dados por el diseño del estudio.

4. OBJETIVOS

4.1. GENERAL

Evaluar el rendimiento diagnóstico de siete técnicas de ELISA para la detección de anticuerpos anti-*T.cruzi* (convencionales y no convencionales) disponibles comercialmente en Colombia, de manera individual y mediante una combinación de dos de ellas de principio antigénico diferente, frente al binomio de pruebas inmunoserológicas (ELISA e IFI) utilizadas como referencia en el algoritmo serológico para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas por el Instituto Nacional de Salud de Colombia.

4.2. ESPECÍFICOS

1. Estimar la sensibilidad, especificidad, exactitud, valores predictivos y razones de verosimilitud de cinco técnicas de ELISA recombinantes, una de péptidos sintéticos y una de extractos antigénicos totales comerciales para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas de manera individual, en muestras de pacientes colombianos frente al estándar de referencia.
2. Estimar las características operativas de los binomios constituidos por una técnica serológica de ELISA convencional y una no convencional, mediante un análisis en serie y en paralelo, frente al estándar de referencia.

5. METODOLOGÍA

5.1. ENFOQUE METODOLÓGICO DEL ESTUDIO

El presente estudio tuvo un enfoque cuantitativo analítico de estimación de características operativas de pruebas diagnósticas, para comparar el rendimiento diagnóstico de pruebas comerciales de ELISA contra pruebas convencionales de referencia para la detección de anticuerpos anti *T.cruzi*, para el diagnóstico de la ECh.

5.2. TIPO Y DISEÑO DEL ESTUDIO

Es un estudio primario, observacional analítico de corte transversal de pruebas diagnósticas donde se estimaron las características operativas (sensibilidad, especificidad, exactitud, valores predictivos y razones de verosimilitud) de siete estuches comerciales para el diagnóstico de la ECh, con muestras provenientes de pacientes colombianos y que adquirieron su infección dentro del territorio nacional.

Las muestras fueron previamente pre-seleccionadas por criterios epidemiológicos, como sospecha de la enfermedad de Chagas, estado clínico del paciente y procedencia del mismo y de laboratorio con los métodos de referencia disponibles actualmente en el LNR del INS, las cuales son técnicas inmunoserológicas (ELISA e IFI), además se contó con material de referencia para dicha práctica (SeraCare™) y con estándares biológicos de referencia internacionales (NIBSC™) validados por la OMS. El procesamiento técnico de las muestras se realizó de forma enmascarada por el investigador, no se conocían los resultados del estándar de referencia, ni tampoco características adicionales de las muestras.

Posteriormente a la estimación de las características operativas individuales de cada prueba, se estimaron las características operativas de las pruebas en metodología múltiple, en serie y en paralelo y se realizaron adicionalmente predicciones con el desempeño de cada uno de los binomios de pruebas en una población y una prevalencia determinada. Aquellas que demostraron un buen desempeño ($\geq 98\%$) fueron incluidas en el rediseño del lineamiento de diagnóstico serológico que existe a nivel nacional.

Adicionalmente, se realizó un análisis de repetibilidad con la estimación del coeficiente de variación (%CV) por el procesamiento de un número de muestras bajo las mismas condiciones técnicas y ambientales.

5.2.1. Estimadores

Para la presente verificación diagnóstica se calcularon los siguientes estimadores, junto con sus intervalos de confianza al 95% (95%IC) (30,67):

- Sensibilidad (S)
- Especificidad (E)
- Exactitud (Ex)
- Valor predictivo positivo (VPP)
- Valor predictivo negativo (VPN)
- Razón de verosimilitud positiva (LR+)
- Razón de verosimilitud negativa (LR-)

5.3. POBLACIÓN

- Pacientes con sospecha de Enfermedad de Chagas mayor de 10 meses de edad, sin importar sexo, ciudad y región de procedencia, estado socioeconómico, orientación sexual o religión.
- Mujeres en cualquier periodo de gestación con antecedente de procedencia o residencia de zona endémica de ECh.
- Lactantes mayores de 10 meses de madres seropositivas para infección por *T.cruzi* (10).
- Personas donantes de sangre que hayan superado los filtros de la encuesta previa.

5.4. DISEÑO MUESTRAL

5.4.1. Muestra

Se utilizaron muestras de suero que estuvieran en óptimas condiciones de almacenamiento y analíticas como ausencia de hemolisis y sin restos de fibrina.

Se describen a continuación las fuentes a partir de las cuales fueron obtenidas las muestras de suero:

a. Seroteca del Laboratorio Nacional de Referencia de Parasitología del INS

Esta seroteca está ubicada en el LNR de Parasitología del INS y cuenta con muestras de suero de pacientes sospechosos con ECh conservadas mediante congelación a $-70^{\circ}\text{C}\pm 5$, las cuales han sido obtenidas con previo consentimiento informado para el uso de estudios adicionales y han sido recolectadas desde el año 2003 a partir de:

- Muestras de pacientes que acudieron al INS, evaluados en consulta por sospecha de ECh desde las diferentes entidades de salud a nivel nacional, que buscaron el servicio de diagnóstico serológico del INS para definir su estado de infección por *T. cruzi*.
- Muestras enviadas desde los Laboratorios de Salud Pública Departamentales (LSPD), procedentes de pacientes con sospecha de ECh que nunca pudieron acceder al diagnóstico serológico en sus entidades de salud.
- Muestras procedentes de pacientes en fase aguda caracterizados por seroconversión y otros por presentar adicionalmente pruebas parasitológicas directas positivas, todos procedentes de brotes de transmisión oral de Chagas.
- Muestras de pacientes procedentes de proyectos de investigación desarrollados en zonas endémicas y no endémicas para la ECh en Colombia.
- Muestras procedentes de donantes de sangre, quienes fueron seropositivos en la prueba de ELISA de tamiz, los cuales buscaron la prueba complementaria de confirmación.

b. Seroteca del Hemocentro Distrital de Bogotá

Se consideró la obtención de muestras de donantes provenientes del Hemocentro Distrital de Bogotá a partir del año 2015, caracterizados como seronegativos para anticuerpos anti-*T. cruzi* mediante la técnica implementada en este banco de sangre para su tamización, adicionalmente estas muestras fueron sometidas a las pruebas serológicas “in house” de referencia del LNR del INS.

c. Material de Referencia (MR) del laboratorio SeraCare™

Material biológico (suero/plasma) diseñado para control, monitoreo, evaluación y validación de técnicas diagnósticas y de investigación, con concentraciones específicas de anticuerpos anti *T. cruzi* y determinadas por fabricantes acreditados

y autorizados para la emisión de material de referencia, el cual está acompañado de documentación en la que se indican los valores determinados de sus propiedades especificadas, así como la incertidumbre y rastreabilidad asociadas, con el uso de procedimientos válidos. El material de referencia utilizado está compuesto por dos paneles de muestras.

- Chagas *T. cruzi* Mixed Titer AccuSet™ Performance Panel (0845-0073): consiste en 21 muestras de plasma naturalmente obtenidos de diferentes individuos. Contiene desde muestras no reactivas a fuertemente reactivas para anticuerpos anti- *T. cruzi*. No se agregaron preservantes a las muestras obtenidas. Para la caracterización de los sueros se utilizaron técnicas serológicas disponibles comercialmente.
 - Chagas *T. cruzi* AccuVert™ Seroconversion Panel (0615-0038): lo componen 10 muestras de plasma naturalmente obtenidos de un único individuo durante el desarrollo de la infección por *T. cruzi* y su consecuente seroconversión. No se agregaron preservantes a las muestras obtenidas. Para la caracterización de los sueros se utilizaron técnicas serológicas disponibles comercialmente y se realizaron en laboratorios de referencia a nivel mundial.
- d. Estándar Biológico de Referencia Internacional, del “The National Institute for Biological Standards and Control” (NIBSC)

Adicionalmente, el estudio contó con los primeros estándares biológicos de referencia internacionales validados y obtenidos por la OMS, para anticuerpos anti- *T. cruzi* (09/186-09/188), los cuales contienen anticuerpos específicos contra *T. cruzi* DTU TcI y TcII, fabricados por “The National Institute for Biological Standards and Control” (NIBSC), constituidos por muestras de origen biológico de pacientes previamente caracterizados con diferentes metodologías serológicas en distintos laboratorios de referencia a nivel mundial (68).

- Chagas (anti-*T. cruzi* I) antibody in Human Plasma (1st International Standard) 09/188: Pool de plasma de origen humano liofilizado de cuatro donantes voluntarios seropositivos, que contiene anticuerpos anti-*T. cruzi*, representativo de pacientes seropositivos de individuos autóctonos de México, región donde predomina el *T. cruzi* TcI, estas preparaciones pueden ser utilizadas para análisis de desempeño diagnóstico de diferentes metodologías serológicas.
- Chagas (anti-*T. cruzi* II) antibody in Human Plasma (1st International



Standard) 09/186: Pool de plasma de origen humano liofilizado de diez donantes voluntarios seropositivos, que contiene anticuerpos anti-*T.cruzi*, representativo de pacientes seropositivos de individuos autóctonos de Brasil, región donde predomina el *T.cruzi*, TcII, estas preparaciones pueden ser utilizadas para análisis de desempeño diagnóstico de diferentes metodologías serológicas.

En el estudio de validación de estos estándares biológicos participaron diez laboratorios nacionales de referencia, cinco laboratorios de investigación, cinco laboratorios de sangre, tres laboratorios de diagnóstico clínico y un ente regulador de equipos y pruebas diagnósticas, distribuidos en 16 países de América Latina y Europa. Se utilizaron 30 ensayos comerciales entre ELISA, HAI, IFI, Quimioluminiscencia (CLIA), Aglutinación de partículas (AP) y Pruebas Rápidas (PRD), además de 10 técnicas “*in house*” Todos los laboratorios entregaron resultados concordantes con lo relacionado en la configuración de los estándares biológicos (68).

El objetivo de incluir los sueros 09/186 y 09/188, fue determinar la reactividad de estos frente a los diferentes antígenos de *T.cruzi* de las técnicas evaluadas en el estudio. Para ello, es importante tener en cuenta que las técnicas comerciales disponibles para la detección de anticuerpos anti *T.cruzi*, generalmente son fabricadas con cepas de linajes que no predominan en la población colombiana, de tal forma los resultados de estos ensayos mostrarán evidencia acerca de la capacidad de los antígenos presentes en las técnicas para detectar pacientes expuestos a TcI y TcII.

Los sueros validados por la OMS, NIBSC 09/186 y 09/188, TcII y TcI respectivamente, fueron analizados con seis de las siete técnicas de este estudio, las cuales detectaron los anticuerpos de cada uno de los estándares biológicos, al igual que la técnica de ELISA e IFI “*in house*”, pruebas de referencia del INS utilizadas para caracterizar previamente las muestras del estudio (Tabla 4).

Los ensayos se realizaron por duplicado, con reactivos del mismo lote de producción de cada una de las técnicas con que fueron procesadas las 501 muestras del panel total de evaluación.

Tabla 4. Reactividad de estándares internacionales NIBCS - OMS

Nombre de la prueba	Fabricante	Tipo de antígenos	Resultados	
			09/188 (Tcl)	09/186 (Tcll)
Test ELISA Chagas III	BiosChile	Antígenos totales	Reactivo	Reactivo
Chagas ELISA IgM+IgG	Vircell	Recombinantes FRA, B13, MACH (PEP2, TcD, TcE, SAPA)	Reactivo	Reactivo
Chagatest ELISA recombinante v 4.0	Wiener	Recombinantes SAPA, Ag1, 2, 13, 30 y 36	Reactivo	Reactivo
BioELISA Chagas	Biokit	Recombinantes TcD, TcE, PEP2, TCL1, TCL2	Reactivo	Reactivo
T. cruzi AB	DIA PRO	Recombinantes	Reactivo	Reactivo
UMELISA Chagas	Tecnosuma	Péptidos sintéticos 17 y 18	Reactivo	Reactivo
ELISA “in house”	LNRP	Extracto crudo Cepa HMRIV TcI	Reactivo	Reactivo
IFI “in house”	LNRP	Extracto crudo Cepa HMRIV TcI	Reactivo	Reactivo

Fuente: Autores, elaborado con base en resultados de sensibilidad de las pruebas evaluadas.

5.4.1.1. Criterios de selección

Se aplicaron los siguientes criterios de selección a las muestras de suero provenientes de las diferentes fuentes:

5.4.1.1.1. Criterios de inclusión

Muestras que cumplan con los siguientes criterios:

- Pacientes colombianos con sospecha de ECh dentro del territorio nacional recolectadas durante los años 2014, 2015 y 2016.
- Sueros almacenados a $-70^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.
- Pacientes con sospecha de ECh que hubiesen otorgado consentimiento informado para estudios adicionales.
- Sueros con resultados de pruebas serológicas para la detección de anticuerpos anti *T. cruzi*.

- Sueros de pacientes con sospecha de ECh con historia clínica o ficha clínico-epidemiológica del LNR del INS.
- Donantes de sangre del Hemocentro Distrital con información de los resultados de las pruebas serológicas de tamizaje y datos demográficos.

5.4.1.1.2. Criterios de exclusión

Muestras que cumplan con los siguientes criterios:

- Evidencia de almacenamiento inadecuado o presencia de contaminación microbiana, fúngica, química como solventes o reactivos.
- Menos de 800uL de suero en cada alícuota.
- Alteraciones o modificaciones en su rotulado.
- Presencia de hemólisis, restos de fibrina o restos macroscópicos no identificados.
- Resultado de una sola prueba serológica para la detección de anticuerpos anti *T.cruzi*.
- Discordancia entre el resultado de la primera prueba y la prueba de confirmación para detección de anticuerpos anti-*T.cruzi*.

5.4.2. Cálculo del tamaño de la muestra

El cálculo del tamaño de la muestra se realizó para un estudio de corte transversal de pruebas diagnósticas con resultado dicotómico (distribución binomial positivo y negativo), para comparar proporciones de sensibilidad y especificidad entre dos pruebas. Para calcular el tamaño total de la muestra se realizaron cálculos independientes para sensibilidad y especificidad, los parámetros de sensibilidad esperados determinaron el número de muestras positivas y los parámetros de especificidad esperados determinaron el número de muestras negativas, además, se tuvo en cuenta el número de estuches que fueron donados por los fabricantes. Se utilizó la siguiente expresión matemática sugerida por Tilaki 2014 (69):

$$n = \frac{\left[Z_{\frac{\alpha}{2}} \sqrt{2 \times \bar{P}(1 - \bar{P})} + Z_{\beta} \sqrt{P_1(1 - P_1) + P_2(1 - P_2)} \right]^2}{(P_1 - P_2)^2}$$

Donde Z_{α} y Z_{β} , tienen los valores estándares de probabilidad de error tipo I (0,05=1,64) y tipo II (0,20=0,84), respectivamente. $\bar{P}$ denota el valor puntual de sensibilidad o especificidad esperado, P_1 indica el máximo valor esperado y P_2 indica el valor mínimo esperado. Para sensibilidad (muestras positivas), $nPos(basado\ en\ Se)$, $\bar{P}$ 96,0%, P_1 100% y P_2 92,5%, amplitud del intervalo de confianza 7,5%. Para especificidad (muestras negativas), $nNeg(basado\ en\ Sp)$ $\bar{P}$ 98,0%, P_1 100% y P_2 93,0%, amplitud del intervalo de confianza 7,0%.

El tamaño total de la muestra fue entonces estimado, así:

$$\begin{aligned} n &= nPos(basado\ en\ Se) + nNeg(basado\ en\ Sp) \\ n &= 256 + 245 \\ n &= 501 \end{aligned}$$

Teniendo en cuenta estos parámetros, el valor máximo esperado con relación a la sensibilidad y especificidad es 100%, debido a que puede haber un acuerdo total entre las pruebas evaluadas y el patrón de referencia, además se considera que cualquier técnica con un desempeño inferior al 92,5% de sensibilidad y/o 93% de especificidad, tiene un desempeño inferior a las técnicas utilizadas como patrón de referencia.

La prevalencia del muestro fue estimada en 51,1% (Tabla 5). Las 501 muestras fueron extraídas de 492 pacientes diferentes, 10 muestras que fueron las pertenecientes al panel AccuVert™ del material de referencia fueron tomadas de un único paciente.

Tabla 5. Distribución porcentual del cálculo de la muestra según valor real

Valor real	Frecuencia	Porcentaje
Positivo	256	51,1
Negativo	245	48,9
Total	501	100

Fuente: Autores con base en cálculos propios basados en cálculo del tamaño de la muestra.

5.4.3. Técnicas serológicas para caracterización de muestras

Las siguientes fueron las pruebas inmunoserológicas que fueron incluidas para establecer el criterio de verdad por laboratorio:



- Técnica de ELISA para detección de anticuerpos de tipo IgG anti *T.cruzi* “in house” de cepa TcI.
- Técnica de IFI para detección de anticuerpos de tipo IgG anti *T.cruzi* “in house” de cepa TcI.
- Técnica de HAI comercial para detección de anticuerpos de tipo IgG anti *T.cruzi* – fabricante Wiener Lab™.
- Técnica de InmunoBlot comercial TESA blot para detección de anticuerpos de tipo IgG anti *T.cruzi* fabricante Biomerieux™.

Veinte (20) muestras tenían adicionalmente el resultado de pruebas parasitológicas tales como, examen directo de muestra de sangre (examen en fresco, gota gruesa, extendido de sangre periférico o método de concentración de microhematocrito) y Técnica de biología molecular - Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR), lo cual se tomó como valor adicional para el criterio de muestra positiva, pero no fue definitivo para la definición del criterio por el patrón de referencia.

5.4.4. Definición del valor por el patrón de referencia

Se estableció un criterio de verdad positivo y negativo (estándar de oro) basado en resultados de pruebas inmunoserológicas de laboratorio. Se analizaron otros criterios como estado clínico del paciente (sintomático o asintomático) y variables epidemiológicas como zona geográfica de procedencia y casos y/o contactos de brotes de transmisión oral ocurridos en el territorio colombiano, únicamente para pre-seleccionar las muestras y confirmar que pertenecían a pacientes con sospecha de ECh.

El criterio de verdad fue establecido de la siguiente manera:

5.4.4.1. Valor de referencia establecido por pruebas de laboratorio

Criterios de muestras positivas

Fue considerada como positiva toda muestra de suero con resultados de técnicas de ELISA e IFI “in house” positivos y adicionalmente el resultado positivo de una o dos técnicas serológicas de un principio diferente (HAI e TESA blot).

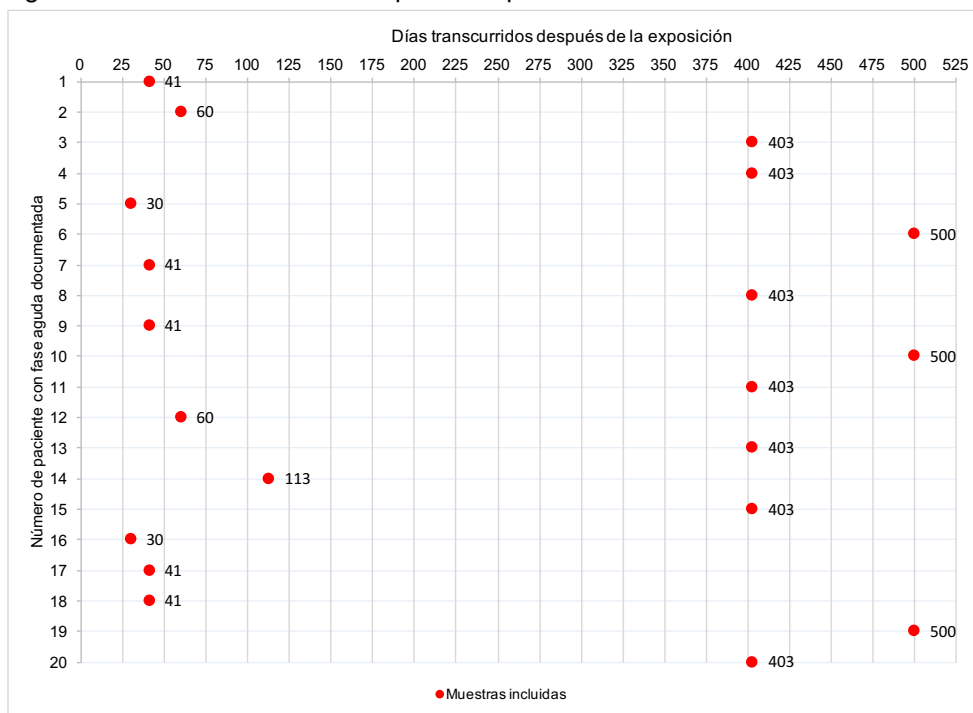
A continuación, se relacionan los indicadores de resultados positivos para cada una de las técnicas:

1. Técnica de ELISA “*in house*” positiva: Densidad Óptica (DO) mayor o igual a 0,300 de absorbancia y con índice mayor o igual a 1.0.
2. Técnica de IFI “*in house*” positiva: título mayor o igual a 1/32.
3. Técnica de HAI positiva: hemaglutinación positiva con título mayor o igual a 1/16
4. Técnica de TESA Blot positiva: presencia de alguna de las bandas de positividad del test.

Aunque el criterio de verdad por laboratorio fue definido únicamente por los resultados de las técnicas inmunoserológicas de referencia, 20 muestras de pacientes independientes contaban adicionalmente con resultados positivos de pruebas parasitológicas en sangre total (examen directo con presencia de tripomastigotes de *T. cruzi*), un valor agregado a la positividad de estas muestras, sin embargo, este resultado no se tuvo en cuenta para la definición del valor por el patrón de referencia.

Se muestra en la Figura 5, en filas, los 20 sueros positivos de los pacientes que tuvieron una fase aguda documentada con pruebas parasitológicas directas positivas adicionales.

Figura 3. Muestras de suero seropositivos provenientes de brotes



NOTA: el marcador rojo indica los días después de la exposición.

Fuente: Base de datos de ingreso de pacientes al Laboratorio Nacional de Referencia de Parasitología.

Criterios de muestras negativas

Fue considerada como negativa toda muestra de suero con resultados de técnicas de ELISA e IFI *“in house”* negativos y adicionalmente el resultado de una o dos técnicas serológicas de un principio diferente (HAI e TESA Blot) negativo.

1. Técnica de ELISA *“in house”* negativa: con DO óptica menor a 0,300 de absorbancia y con índice menor a 1.0.
2. Técnica de IFI *“in house”* negativa: con títulos menores o iguales a 1/16.
3. Técnica de HAI negativa: con hemaglutinación negativa con título menor a 1/16.
4. Técnica de TESA Blot negativa: ausencia de todas las bandas de positividad del test.

5.4.4.2. Criterios adicionales

Se analizó la información procedente de dos variables importantes, estado clínico del paciente en el momento de la toma de la muestra y el nexa epidemiológico con otros pacientes como ciudad y región de procedencia, además de procedencia de brotes. Estos criterios representaron un valor agregado, pero no se tuvieron en cuenta como factores decisivos para clasificar la muestra como positiva o negativa.

5.4.5. Procedimiento de disposición de las muestras

5.4.5.1. Selección de las muestras

Para el presente estudio se realizó un muestreo no probabilístico, se seleccionaron las muestras basados en los criterios de selección, las muestras fueron tomadas de 492 pacientes, como se describe a continuación

- Selección de muestras de la seroteca del INS

La seroteca del INS cuenta con la información de los ingresos tabulados en una base de datos, se registran los datos demográficos, epidemiológicos, clínicos y los resultados de pruebas diagnósticas, a partir del año 2004. El proceso de selección de muestras de esta fuente fue el siguiente:

- 1) Se filtró la base de datos por año, obteniendo solo muestras tomadas en el 2014, 2015 y 2016.

- 2) Se depuró la base de datos teniendo en cuenta los criterios de selección y de verdad nombrados anteriormente.
 - 3) Se originó una base de datos secundaria con las muestras que cumplieron cada uno de los criterios y se ordenaron de forma descendente según el número interno del Programa Nacional de Vigilancia por Laboratorio
- Selección de muestras del Hemocentro Distrital

Las muestras provenientes de la seroteca del Hemocentro Distrital de Bogotá fueron seleccionadas aleatoriamente por el profesional referente de la evaluación del marcador de la ECh, se extrajo la información con relación al código de la muestras y del resultado de la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi*, posteriormente fueron enviadas con triple embalaje al LNR de Parasitología con resultados negativos al marcador de infección.

5.4.5.2. Extracción, organización, etiquetado y almacenamiento

Una vez seleccionadas las muestras de suero, se trataron de la siguiente manera:

1. Fue generada una nueva base de datos con las siguientes variables: código interno de la muestra proveniente del programa, código del sistema Enterprise (software interno de control de muestras del LNR), nombre del paciente, datos demográficos (edad, sexo, procedencia), fecha de realización y resultados de las pruebas serológicas. La base de datos estuvo protegida digitalmente y solo fue manipulada por el investigador principal con el objeto de proteger la información.
2. De cada una de las muestras extraídas se realizaron tres alícuotas independientes en viales de polipropileno, las cuales fueron identificadas con series de números aleatorios diferentes y llevadas a -20°C hasta el momento de realizar los ensayos.
3. Un día antes del inicio de los ensayos, las muestras fueron trasladadas a refrigeración entre 4 y 8°C.

5.4.5.3. Consideraciones generales del procesamiento

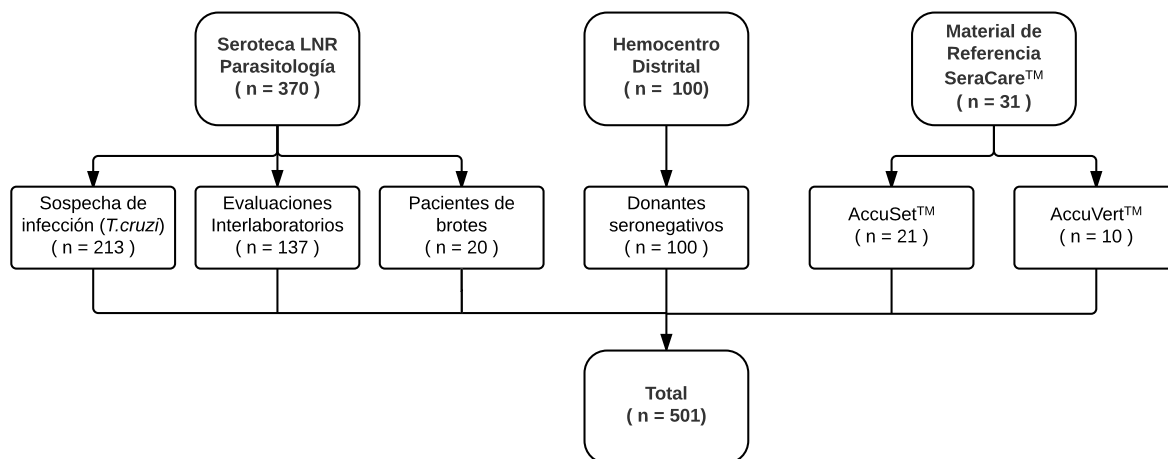
- Cada muestra de suero fue procesada por todos los siete estuches incluidos en el estudio (muestras emparejadas).

- El procesamiento analítico de las muestras se llevó a cabo de acuerdo a las recomendaciones y procedimientos descritos en el inserto de cada estuche sin ninguna modificación.
- Se procesaron las muestras en condiciones óptimas controladas de laboratorio, con un antecedente de monitoreo de condiciones ambientales que garantizó la temperatura y humedad relativa del proceso.
- Los equipos de lavado y lectura cuentan con intervenciones metrológicas periódicas realizadas por una entidad autorizada para dichos procedimientos.
- Las intervenciones metrológicas fueron programadas por un profesional experto de la Subdirección de Calidad de la Dirección de Redes en Salud Pública del Instituto Nacional de Salud.
- Las muestras de suero fueron procesadas por los diferentes ensayos de ELISA por dos profesionales con experticia en la práctica. Teniendo en cuenta que un estuche fuera procesado por un solo analista.

5.4.5.4. Descripción de las muestras

A continuación, se describe la distribución de las muestras según su fuente (Figura 4):

Figura 4. Distribución de las muestras según fuente



Fuente: Autores con base en la metodología de la investigación.

Las muestras procedentes de la Seroteca del LNR de Parasitología contaron con información demográfica como grupo de edad, sexo, estado clínico y procedencia (Tabla 6), las muestras procedentes del Hemocentro Distrital y del Material de Referencia, no contaban con la información antes nombrada debido a que no tenía

relevancia en el estudio, por tanto, solo se ingresaron como muestras de donantes y como material de referencia, respectivamente.

Tabla 6. Distribución porcentual y características de muestras de Seroteca LNR Parasitología

Características	Sospecha de infección n = 213		Pacientes de brotes n = 20	
	n	%	n	%
Edad grupo				
Total	213	100%	20	100%
0 a 18	7	3,3%	0	0%
19 a 40	29	13,6%	10	50%
41 a 65	104	48,8%	10	50%
Mayor de 65	73	34,3%	0	0%
Sexo				
Total	213	100%	20	100%
Femenino	106	49,8%	7	35%
Masculino	87	40,8%	13	65%
Sin dato	20	9,4%	0	0%
Estado clínico				
Total	213	100%	20	100%
Asintomático	42	19,7%	0	0%
Sin dato	104	48,8%	0	0%
Sintomático	67	31,5%	20	100%
Procedencia Paciente				
Total	213	100%	20	100%
Antioquia	3	1,4%		
Arauca	1	0,5%		
Banco de Sangre INS	2	0,9%		
Bogotá	12	5,6%		
Boyacá	12	5,6%		
Caldas	1	0,5%		
Casanare	20	9,4%	13	65,0%
Cauca	8	3,8%		
Cesar	2	0,9%	3	15,0%
Cundinamarca	95	44,6%	1	5,0%
Guainía	1	0,5%		
Guajira	1	0,5%		
Huila	1	0,5%		
INS particular	3	1,4%		
Magdalena	1	0,5%		
Meta	10	4,7%	2	10,0%
Norte de Santander	4	1,9%		
Red Chagas	3	1,4%		
Santander	29	13,6%		
Sierra Nevada	1	0,5%		
Sucre	0	0,0%	1	5,0%
Tolima	3	1,4%		

Fuente: Autores con base en la descripción de las muestras

5.4.6. Reactivos (pruebas evaluadas) y equipos utilizados

5.4.6.1. Pruebas de ELISA

Los reactivos utilizados en este estudio, fueron adquiridos por medio de donación de los proveedores y fabricantes de las diferentes técnicas de ELISA, bajo un proceso público, abierto, voluntario y transparente para su adquisición, cumpliendo con las siguientes etapas:

- Convocatoria externa número 5000-21783 del 23 de Noviembre de 2015, la cual tenía por objetivo principal invitar a los proveedores de las técnicas ELISA que eran utilizadas por los Laboratorios de Salud Pública Departamentales (LSPD) y la Red de Bancos de Sangre de Colombia, para que participaran voluntariamente en este estudio (Anexo 3) .
- Envío de una carta de intención por parte de los proveedores, manifestando la aceptación de su participación voluntaria, las condiciones del estudio y la donación de los estuches necesarios.
- Reunión general el día 18 de enero de 2016 con todos los proveedores que aceptaron la participación en el estudio, donde se dieron a conocer los objetivos, propósitos y metodología; se hicieron las respectivas recomendaciones y se manifestó que los resultados obtenidos se divulgarían por parte del INS a través de una recomendación técnica, un informe técnico detallado y una publicación en revista indexada.

A continuación, se describen las técnicas (Tabla 7): y algunas características operacionales de las pruebas incluidas en el estudio (Tabla 8):

Tabla 7. Técnicas ELISA sometidas a estudio

Método	Fabricante	Fracciones antigénicas	Cepa/DTU	S (%)*	E (%)*
Métodos convencionales (extracto total)					
Test ELISA Chagas III	Grupo BIOS (Santiago, Chile)	Extractos totales + antígenos de membrana	Tulahuen y Mn/ TcII	100	100
Métodos no convencionales					
Péptidos sintéticos					
Umelisa Chagas	Tecnosuma internacional (La Habana, Cuba)	Péptido 17 y 18	Sin dato	100	100
Antígenos recombinantes					
Architect System Chagas	Abbott(Alemania)	FP3, FP6, FP10 y TcF	Sin dato	99 – 100 **	99 -100 **
BioELISA Chagas	Biokit (Barcelona, España)	TcD, TcE, PEP2, TCL1, TCL2	Sin dato	100	97,4 - 99,5 **
Chagatest ELISA rec v4	Wiener Lab. (Rosario, Argentina)	SAPA, Ag1, Ag2, Ag13, Ag30 y Ag 36	Sin dato	99,13 – 100 **	98,30 – 99,66 **
T. cruzi AB	Diagnostics Bioprobes (Milano, Italia)	Sin dato ^{SD}	Sin dato	100	>99,5
Chagas ELISA IgM + IgG	Vircell Microbiologists (Granda, España)	FRA, B13, MACH (PEP2, TcD, TcE, SAPA)	Sin dato	100	98

*Sensibilidad y especificidad de los estudios reportados en el inserto de cada técnica,

**valor mínimo y máximo del rango establecido por más de un estudio reportado en el inserto

Sin dato: el dato específico no se registra en el inserto ni tampoco es dado a conocer por el fabricante.

^{SD} No se dispone de la información relacionada a los antígenos de la prueba

Fuente: Autores con base en metodología del estudio



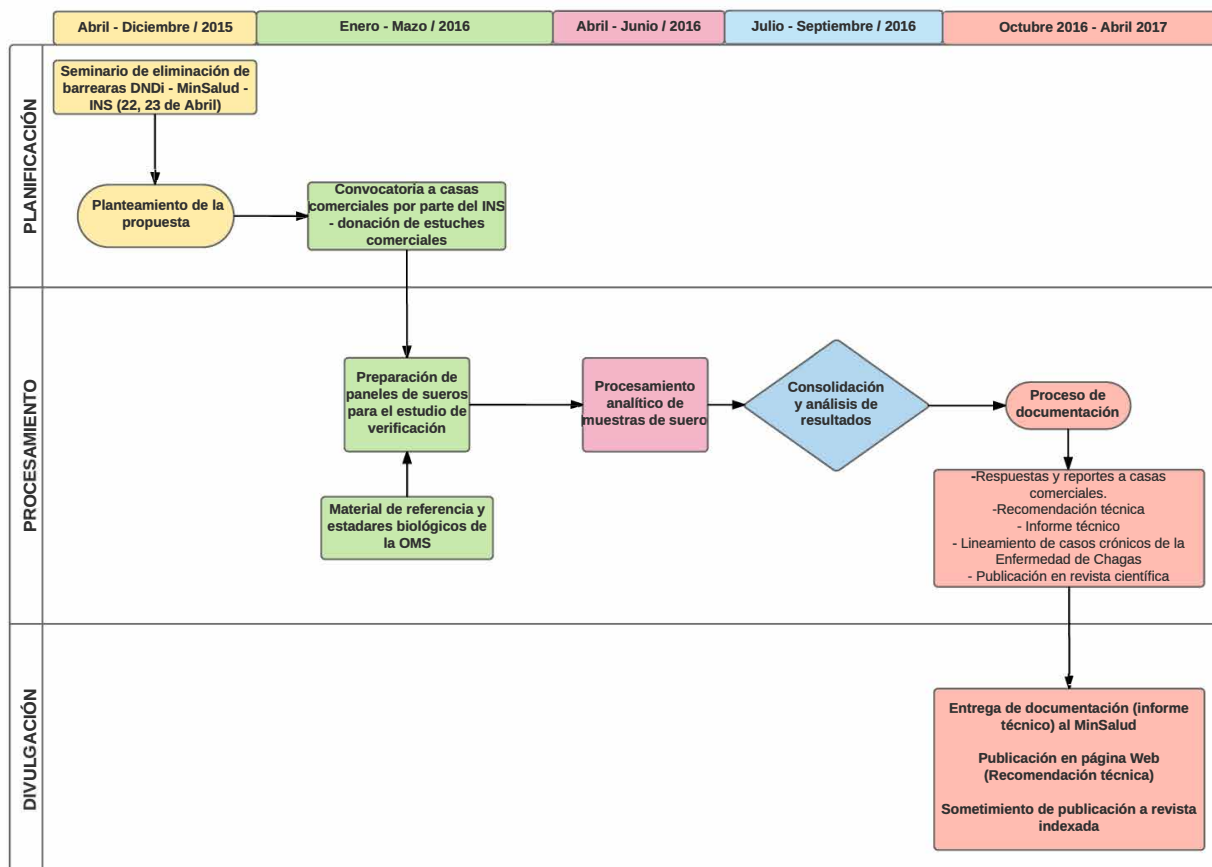
Tabla 8. Especificaciones técnicas de pruebas ELISA

Fabricante y Kit	Vircell	BiosChile	Abbott	Wiener	DiaPro	Tecnosuma	Biokit
Característica	Chagas Elisa IgG	Test Elisa Chagas III	Architect Chagas	Chagatest v4.0	T. cruzi Ab	Umelisa Chagas	BioELISA Chagas
Tipos de anticuerpos que son detectados por el método	IgG / IgM	IgG	IgG	IgG	IgG / IgM	IgG	IgG / IgM
Tipo de muestra que utiliza el método	Suero	Suero/Plasma	Suero/Plasma	Suero/Plasma	Suero/Plasma	Suero/Plasma	Suero/Plasma
Tipo de lector necesario	Abierto	Abierto	Cerrado	Abierto	Abierto/Cerrado	Cerrado	Abierto/Cerrado
Rango de dudosos dentro de la técnica por estandarización	Si	Si	Si	No	Si	Si, solo en muestras pareadas	Si
Amplitud de la zona gris	Índice de anticuerpos de 9 a 11	10% alrededor del Cut-off	Automático en cada corrida	No aplica	Automático en cada corrida	Automático en cada corrida	<0,9 a >1
Protocolo de Control de Calidad Interno, validación de los resultados e interpretación de resultados	Cálculo del cut-off con D.O de la muestra/media de D.O del suero control por 10	Cálculo del cut-off con promedio de controles positivos y negativos por 0,35	Por DO de los controles	Promedio de las D.O. del Control Negativo + 0,200	Promedio de las D.O. del Control Negativo + 0,200	(Fi-BB) / (P-BB) 0,300	Valor umbral= promedio de controles negativos + 0,300
Número de reactivos a preparar en el ensayo	1 Reactivo	1 Reactivo	Más de 3 reactivos	2 reactivos	2 reactivos	3 reactivos	2 reactivos
Volumen de muestra requerida	<10 uL	10- 20ul	Más de 31 uL	10- 20ul	10- 20ul	<10 uL	10- 20ul
Cambio de color del buffer de dilución de la muestra para facilidad de su uso	No	Si	No	Si	No	No	No
Tiempo de ejecución del ensayo en minutos (tiempos de incubación y lavados)	<120 minutos	<120 minutos	>120 minutos	<120 minutos	<120 minutos	<120 minutos	<120 minutos
Reactivo de parada de la reacción final	Si	Si	Si	Si	Si	No	Si
Estabilidad de la reacción final (después de solución de parada, determinada en minutos)	60	60	Inmediata	10	Inmediata	Inmediata	30
Material adicional requerido (placas para diluciones)	No requiere	No requiere	No requiere	No requiere	No requiere	Requiere placas para dilución	No requiere
Inserto en español e impreso	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si

Fuente: Autores con base en el Inserto de cada una de los fabricantes.

Se presenta un diagrama donde se describen los tiempos que fueron utilizados para el desarrollo de este estudio (Figura 5):

Figura 5. Diagrama de flujo y tiempos del estudio



Fuente: Autores con base en la metodología del estudio.

5.4.6.2. Equipos utilizados

Para el desarrollo del presente estudio, se utilizaron los siguientes equipos (Tabla 9):

Tabla 9. Equipos utilizados, especificaciones y trazabilidad metrológica

Equipo	inventario	Especificaciones técnicas	Operaciones de confirmación metrológica
Lector de ELISA – Multiskan EX Thermo Scientific	25393	Con disponibilidad del filtro de lectura de 450 nm y filtro diferencial de 620 nm	Calibración BIOFÍSICA Certificado No. LB-I-002-2015 Fecha: 2015-01-29 Placa Verificación Serie 1043-3 Calibración BIOFÍSICA Certificado No. LB-I-OPT-014-2016 Fecha: 16/02/2016 Verificación intermedia interna Fecha: 2016-04
Lavador de placas de ELISA	25387	No aplica	Mantenimiento PROVEO LTDA Certificado BOG-7910-2014 Fecha: 26/11/2014
Incubadora	25206	Capaz de suministrar una temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$	Calibración INGOBAR Metrología S.A.S Certificado IM-TEM-0263 Fecha: 2014-12-02 Calificación de desempeño INGOBAR Metrología Certificado ING-CAL-380-2015 Fecha: 2015-02-27 Calibración ALPHA METROLOGÍA S.A.S. Certificado No. ALT-1522-15 Fecha: 2015-12-21 Mantenimiento y verificación intermedia KASAI LTDA. Certificado No. 24095 Fecha: 2016-02-03
Micropipeta monocanal	23254 GPR 008	Capacidad de 20 μl a 200 μl	Calibración INGOBAR Metrología S.A.S Certificado No. IM-VOL-0440 Fecha: 2014-11-13 Calibración Unión Metrológica Certificado No. 0851 Fecha: 2015-11-20
Micropipeta monocanal	23254 GPR 009	Capacidad de 100 μl a 1000 μl	Calibración INGOBAR Metrología S.A.S Certificado No. IM-VOL-0302 Fecha: 2014-10-27 Fecha: 2015-11-19 Calibración Unión Metrológica Certificado No. 0844
Micropipeta monocanal	24515	Capacidad de 10 μl a 100 μl	Calibración Unión Metrológica Certificado No. 0845 Fecha: 2015-11-19
Micropipeta monocanal	24707	Capacidad de 5 μl a 50 μl	Calibración Unión Metrológica Certificado No. 0852 Fecha: 2015-11-20
Nevera almacenamiento de muestras Refrigerador REVCO	9018	Capaz de suministrar temperatura de $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$	Mantenimiento y verificación KASAI LTDA. Certificado No. SD Fecha: 2015-03-11 Calificación de desempeño INGOBAR Metrología S.A.S Certificado ING-CAL-397-2015 Fecha: 2015-03-20 Verificación de temperatura 201501 a 201608
Nevera almacenamiento de reactivos	28291	Capaz de suministrar temperatura de	Mantenimiento y verificación KASAI LTDA. Certificado No. SD Fecha: 2015-03-11 Calificación de desempeño INGOBAR Metrología S.A.S Certificado ING-CAL-454-2015 Fecha: 2015-05-26 Verificación de temperatura 201501 a 201608
Ultra congelador almacenamiento de muestras THERMO	28174	Capaz de suministrar temperatura de $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$	Mantenimiento y verificación KASAI LTDA. Certificado No. SD Fecha: 2015-05-01 Verificación de temperatura 201502 a 201507

NOTA: todos los equipos cuentan con un cronograma estricto de intervenciones metrológicas, documentadas y regidas por el Sistema Integrado de Gestión de la Calidad del INS. Los equipos de tecnología cerrada que se utilizaron en el presente estudio fueron verificados por ingenieros provenientes de las diferentes casas comerciales.

Fuente: Autores con base en los informes de metrología del Instituto Nacional de Salud que reposan en las instalaciones del Laboratorio Nacional de Parasitología del Instituto Nacional de Salud.

5.5. DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES

Las variables de las muestras utilizadas en el presente estudio se nombran a continuación, para observar la operatividad de las mismas (Anexo 1):

- Año de toma de la muestra
- Resultados de prueba de referencia (ELISA, IFI, PCR, Inmunoblot, examen directo).
- Departamento de procedencia
- Edad
- Sexo
- Estado clínico

5.6. TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN

5.6.1. Fuente de información

La fuente de información es primaria, las unidades de análisis fueron los resultados de las muestras de suero que se procesaron por cada una de las siete técnicas serológicas de ELISA.

Los resultados de cada corrida analítica fueron validados de acuerdo a los criterios de validación interna de cada una de las pruebas, incluidos en el manual o inserto de las técnicas.

5.6.2. Instrumento de recolección de información

Los resultados fueron obtenidos de forma física a través del equipo lector del inmunoensayo, tanto abierto como específico para algunas de las técnicas, con los cuales se obtuvo el índice de interpretación que permitió catalogar la muestra en positivo, indeterminado y negativo.

Las muestras indeterminadas fueron manejadas como indica el fabricante en su hoja de instrucciones.

Los resultados de los procesamientos de las muestras junto con su interpretación, fueron incluidos en una base de datos en Microsoft Excel, que solo y únicamente fue manipulada por el investigador principal con el objetivo de salvaguardar la seguridad e integridad de la misma.

5.6.3. Proceso de la obtención de la información

Las características operativas en términos de sensibilidad, especificidad, exactitud, valores predictivos y razones de verosimilitud de las técnicas de ELISA evaluadas fueron estimadas con base en los resultados del procesamiento de muestras de suero. Este proceso se realizó en las instalaciones del Laboratorio Nacional de Referencia de Parasitología del Instituto Nacional de Salud de Colombia, durante el periodo entre abril y septiembre de 2016.

5.7. CONTROL DE ERRORES Y SESGOS

Con el objetivo de garantizar la validez interna y externa del presente estudio, el posible riesgo de sesgo se controló de la siguiente manera:

- Selección de los pacientes

Las muestras de los pacientes fueron seleccionadas a partir de tres fuentes diferentes, la seroteca del Programa Nacional de Chagas del Laboratorio Nacional de Referencia de Parasitología del INS, seroteca de donantes seronegativos del Hemocentro Distrital de Bogotá y del material de referencia comercial para anticuerpos anti-*T. cruzi*, teniendo en cuenta los criterios de selección descritos anteriormente.

Las muestras fueron seleccionadas teniendo en cuenta todo el espectro de la infección, desde muestras de pacientes con fase aguda documentada y reciente con seroconversión evidente, muestras de pacientes en fase crónica indeterminada asintomáticos y muestras de pacientes con marcadas cardiopatías chagasicas.

Las muestras de donantes seronegativos del Hemocentro Distrital de Bogotá, fueron seleccionadas por esta entidad, teniendo en cuenta el bajo riesgo que demostró el donante en la encuesta de inclusión, lo cual asegura una menor probabilidad pre prueba de tener la infección.

Los paneles de muestras de suero comerciales de SeraCare, obtenidos comercialmente, contienen muestras con diferentes concentraciones de anticuerpos, de hecho, uno de éstos paneles contiene muestras obtenidas del mismo paciente desde la seronegatividad, hasta la seroconversión con concentraciones mayores de anticuerpos por presencia de infección con *T. cruzi*.

- Estándar de Referencia

Para la enfermedad de Chagas no existe un “estándar de oro” de pruebas serológicas, ni tampoco una técnica específica validada y sugerida por la OMS, las pruebas de referencia generalmente son creadas localmente bajo parámetros establecidos por los expertos de diferentes entidades sanitarias internacionales. Teniendo esto en cuenta, las pruebas de referencia para la detección de anticuerpos anti *T. cruzi* en Colombia, han sido desde hace más de una década utilizadas por el LNR del Instituto Nacional de Salud, las cuales son configuradas con cepas de pacientes colombianos procedentes de infecciones locales. Por otra parte, el estándar de referencia del presente estudio no es el desempeño de una única prueba diagnóstica, si no, la combinación de varias metodologías que actualmente son las pruebas de referencia a nivel nacional.

- Sesgo de verificación “*Work-up bias*”

Todas las muestras de suero incluidas en el panel para el estudio fueron sometidas a las pruebas utilizadas como estándar de referencia, no hubo una verificación parcial de las muestras por el patrón de referencia. Todas las muestras del estudio contaron con resultados previos derivados del mismo instrumento de medición.

- Sesgo de incorporación

Ninguna de las técnicas evaluadas, hace parte de las técnicas utilizadas como estándar de referencia, ambos grupos, tanto como las pruebas evaluadas y las pruebas de referencia, son pruebas independientes.

- Enmascaramiento en la interpretación de las pruebas

Una vez seleccionadas las muestras de suero del estudio, se realizaron alícuotas para las diferentes técnicas a evaluar, las cuales se identificaron con códigos aleatorios de tres dígitos para enmascarar el valor real y aleatorizar el orden de las muestras. De tal forma, en cada uno de los procesamientos realizados por cada técnica de ELISA, los valores reales de referencia (positivo/negativo) estaban enmascarados para el investigador, es decir que en ningún momento durante el procesamiento se conocían los resultados del estándar de referencia. Una vez procesadas todas las técnicas de ELISA, se abrieron las claves de los valores reales. De esta forma se controló el sesgo de sospecha clínica o revisión.

- Exclusiones o indeterminados

Antes de la conformación final del panel de muestras de suero definitivo, se garantizó que el volumen requerido para el procesamiento de todas y cada una de las técnicas fuera el suficiente, evitando así la pérdida de unidades en el estudio. No se obtuvieron al final de las corridas resultados indeterminados. De esta manera se controló el sesgo de exclusiones o indeterminados.

- Interpretación de resultados

La interpretación de los resultados de los procesamientos de los sueros se realizó de acuerdo a lo manifestado por los fabricantes de las técnicas serológicas y la lectura de la densidad óptica se realizó de forma automatizada con equipos que contaban con una trazabilidad metrológica garantizada que incluye mantenimientos preventivos y previas verificaciones. De esta manera se controló la pérdida de objetividad en la interpretación de los resultados.

5.8. TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS

5.8.1. Procesamiento de datos

Una vez construidas las bases de datos se realizó el análisis univariado que consistió en determinar la frecuencia de resultados positivos y negativos por cada una de las pruebas evaluadas, posteriormente en el análisis bivariado se tomaron en cuenta estos resultados junto con los resultados del patrón de referencia.

Se originaron tablas de 2x2 para cada una de las técnicas evaluadas, donde las columnas correspondían al valor establecido por el estándar de referencia (positivo/negativo) y en las filas se presentaba el valor de la prueba evaluada (positivo/negativo).

5.8.2. Análisis de datos

5.8.2.1. Estimación de características operativas individuales

Con la información completa, se procedió a calcular sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, exactitud, razón de verosimilitud positiva y razón de verosimilitud negativa y el intervalo de confianza al 95%, en el software Epidat 3.0.

5.8.2.2. Estimación de características operativas de los binomios

Adicionalmente, se estimaron las características operativas de los binomios conformados por las técnicas verificadas por medio de pruebas múltiples en serie y en paralelo. Para las pruebas en paralelo se realizaron los cálculos para cada combinación posible (21 en total) y para las pruebas en serie se realizó el cálculo solo iniciando con antígenos totales y péptidos sintéticos.

5.8.2.3. Predicciones del rendimiento en simulación en población y prevalencia determinada

Se realizaron predicciones del rendimiento de las técnicas y de los diferentes binomios con el fin de analizar con números absolutos como puede ser el comportamiento de las mismas, incluso adicionando una tercera prueba para definir discordancias, que en este caso es la Inmunofluorescencia indirecta, se asumió una población de 10.000 habitantes, simulando prevalencias de 1%, 10%, 20% y 40% y tomando en cuenta la sensibilidad y la especificidad de las técnicas evaluadas

Se estimaron mediante un análisis de predicciones las tasas de falsos positivos y negativos, se estimó el número de pacientes que podrían requerir una tercera prueba (IFI) para resolver las discordancias, además de los pacientes adecuadamente diagnosticados como seropositivos y aquellos que no podrían ser detectados por ninguna de las pruebas utilizadas, el proceso se realizó de la siguiente manera:

5.8.2.3.1. Análisis en serie

Se calculó el rendimiento secuencial por cada una de las pruebas y se consolidó la cantidad de falsos positivos y negativos al final de todas las pruebas, de la siguiente manera:

Primera prueba: se multiplicó la sensibilidad de la primera prueba por el número de enfermos y la especificidad por el número de sanos, se complementó la tabla de 2x2, así:

Cálculo de rendimiento de primera prueba

Se_1 : sensibilidad primera prueba

Sp_1 : especificidad primera prueba



	<i>Enfermos</i>	<i>Sanos</i>	<i>Total</i>
<i>+</i>	$a_1 = Se_1 * enf$	$b_1 = sanos - d_1$	$a_1 + b_1$
<i>-</i>	$c_1 = enf - a_1$	$d_1 = Sp_1 * sanos$	$c_1 + d_1$
	<i>Enf</i>	<i>Sanos</i>	<i>total</i>

Segunda prueba después de la primera: solo se aplica a los positivos de la primera prueba, producto de la sensibilidad de la segunda prueba por los enfermos y la especificidad de la segunda prueba por los sanos. Posterior se complementó la tabla de 2x2.

Cálculo de rendimiento de segunda prueba después de la primera

Se_2 : sensibilidad segunda prueba

Sp_2 : especificidad segunda prueba

	<i>Enfermos</i>	<i>Sanos</i>	<i>Total</i>
<i>+</i>	$a_2 = Se_2 * a_1$	$b_2 = b_1 - d_2$	$a_2 + b_2$
<i>-</i>	$c_2 = a_1 - a_2$	$d_2 = Sp_2 * b_1$	$c_2 + d_2$
<i>Total</i>	a_1	b_1	$a_1 + b_1$

Tercera prueba (IFI): solo a los discrepantes entre la primera y segunda ELISA, se aplica la tercera técnica, producto de la sensibilidad de la IFI por el número de enfermos y la especificidad de la IFI por el número de sanos.

Cálculo de rendimiento de tercera prueba

Se_3 : sensibilidad tercera prueba

Sp_3 : especificidad tercera prueba

	<i>Enfermos</i>	<i>Sanos</i>	<i>Total</i>
<i>+</i>	$a_3 = Se_3 * c_2$	$b_3 = d_2 - d_3$	$a_3 + b_3$
<i>-</i>	$c_3 = c_2 - a_3$	$d_3 = Sp_3 * d_2$	$c_3 + d_3$
<i>Total</i>	c_2	d_2	$c_2 + d_2$

Consolidación de rendimiento

	<i>Enfermos</i>	<i>Sanos</i>	<i>Total</i>
<i>+</i>	$a = a_2 + a_3$	$b = b_2 + b_3$	$a + b$
<i>-</i>	$c = c_1 + c_3$	$d = d_1 + d_3$	$c + d$
<i>Total</i>	$a + c$	$b + d$	$a + b + c + d$

En cada paso se calcularon las tasas de falsos negativos y positivos y los valores predictivos.

5.8.2.3.2. Análisis en paralelo

Se calculó la sensibilidad y especificidad del binomio aplicado simultáneamente y posteriormente fue necesario relacionar la sensibilidad y especificidad de una tercera prueba en caso de discordancias, de la siguiente manera:

Primera prueba = $P_1 (Se_1, Sp_1)$

Segunda prueba = $P_2 (Se_2, Sp_2)$

Sensibilidad neta (Se_n) = $(Se_1 * Se_2)$

Especificidad neta (Sp_n) = $(Sp_1 * Sp_2)$

Para ver cuantos tendrán por lo menos un resultado positivo

$[Se_1 + Se_2 - (Se_1 * Se_2)] * \text{total de enfermos}$

Para ver cuantos tendrán por lo menos un resultado negativo

$[Sp_1 + Sp_2 - (Sp_1 * Sp_2)] * \text{total de sanos}$

	<i>Enfermos</i>	<i>Sanos</i>	<i>Totales</i>
$+P_1$ $+P_2$	$a_1 = Se_n * Enf$	$c_1 = d - (d + f)$	$a + b$
$+P_1$ $-P_2$	$c_1 = (Se_1 * Enf) - a$	$d_1 = (Sp_2 * sanos) - d$	$c + d$
$-P_1$ $+P_2$	$e_1 = (Se_2 * Enf) - a$	$f_1 = (Sp_1 * sanos) - d$	$e + f$
$-P_1$ $-P_2$	$g_1 = a - (c + e)$	$d_1 = Sp_n * sanos$	$g + h$
<i>Totales</i>	<i>Total enfermos</i>	<i>Total sanos</i>	

Tercera prueba: solo a los discrepantes de las dos primeras ELISA, se aplica la tercera técnica, multiplicando la sensibilidad de la IFI por el número de enfermos y la especificidad por el número de sanos.

Se_3 : sensibilidad tercera prueba

Sp_3 : especificidad tercera prueba

	<i>Enfermos</i>	<i>Sanos</i>	<i>Total</i>
$+$	$a_3 = Se_3 * (c_1 + e_1)$	$b_3 = d_3 - (d_1 + f_1)$	$a_3 + b_3$
$-$	$c_3 = a_3 - (c_1 + e_1)$	$d_3 = Sp_3 * (d_1 + f_1)$	$c_3 + d_3$
<i>Total</i>	$c_1 + e_1$	$d_1 + f_1$	$c_3 + d_3 + e_3 + f_3$



Consolidación de rendimiento

	<i>Enfermos</i>	<i>Sanos</i>	<i>Total</i>
<i>+</i>	$a=a_1+a_3$	$b=c_1+b_3$	$a+b$
<i>-</i>	$c=g_1+c_3$	$d=d_1+d_3$	$c+d$
<i>Total</i>	$a+c$	$b+d$	$a+b+c+d$

En cada paso se calcularon las tasas de falsos negativos y positivos y los valores predictivos.

6. CONSIDERACIONES ÉTICAS

La investigación realizada en el presente estudio se considera sin riesgo, de acuerdo a la Resolución número 8430 del 04 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud.

Además, el estudio se ajusta a las normas en materia de investigación científica en seres humanos, de acuerdo a las declaraciones de Helsinki de 1964 y enmendada por la 64ª Asamblea General, Fortaleza, Brasil en octubre de 2013.

Adicionalmente las muestras de suero incluidas en el estudio contaban con un consentimiento informado otorgado por el paciente o su representante legal, en el cual autorizaban el uso de las muestras para estudios de investigación adicionales al objeto de diagnóstico o confirmación diagnóstica por el cual fue extraída la muestra de sangre, con la capacidad de libre elección y sin ningún tipo de coacción alguna. Debido a que este estudio utilizó diferentes fuentes de muestras de suero y procedieron de diferentes proyectos de investigación e intervenciones en salud pública, no es posible anexar todos los modelos de consentimientos utilizados en la totalidad de las muestras.

La presente investigación no se sometió a Comité Técnico o Comité de ética debido a que se trata de un proyecto relacionado con la misión directa de la Red Nacional de Laboratorio; sin embargo, el estudio cuenta con aval institucional por parte de la Dirección de Redes en Salud Pública del Instituto Nacional de Salud (Anexo 2).

De igual manera, la adquisición de las técnicas y del número de estuches utilizados en el estudio, se realizó por medio de una convocatoria pública (Anexo 3) dirigida desde el INS a cada una de las casas comerciales que distribuyen las técnicas en el país, fue un proceso transparente, público y sin conflicto de intereses, se informó al público que el instituto Nacional de Salud no podrá recomendar ninguna de ellas para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas.

7. RESULTADOS

7.1. CARACTERÍSTICAS OPERATIVAS INDIVIDUALES

Según lo estimado para el presente estudio, se procesaron un total de 501 muestras de suero procedentes de 492 pacientes caracterizadas previamente por el patrón de referencia, 256 (51,1%) positivas y 245 (48,9%) negativas. El 85,2% (n=427) del total, fueron clasificadas adecuadamente por todas las pruebas ELISA tanto convencionales como no convencionales (Tabla 10).

De las muestras positivas, el 86,7% (n=222) fueron identificadas por todas las técnicas y de las muestras negativas el 83,67% (n=202) fueron correctamente caracterizadas como tal por la totalidad de las técnicas analizadas.

Tabla 10. Resultados de técnicas ELISA evaluadas frente a patrón de referencia

Nombre del Kit	Fabricante	Total de muestras	Muestras positivas*	Resultados positivos		Muestras concordantes			Muestras discordantes		
				n	%	Total	VP	VN	Total	FP	FN
Test ELISA Chagas III	Bios Chile	501	256	259	51,7%	494	254	240	7	5	2
Chagas ELISA IgM+IgG	Vircell	501	256	261	52,1%	494	255	239	7	6	1
Chagatest ELISA v 4.0	Wiener	501	256	258	51,5%	493	253	240	8	5	3
Architect Chagas	Abbott	501	256	257	51,3%	492	252	240	9	5	4
BioELISA Chagas	Biokit	501	256	264	52,7%	483	251	232	18	13	5
T. cruzi AB	DIA PRO	501	256	252	50,3%	483	245	238	18	7	11
UMELISA Chagas	Tecnosuma	501	256	243	48,5%	476	237	239	25	6	19

n: número de muestras con resultado positivo en cada técnica evaluada

%: porcentaje de muestras positivas en cada técnica

VP: número de verdaderos positivos

FP: número de falsos positivos

FN: número de falsos negativos

VN: número de verdaderos negativos

Fuente: Autores con base en los resultados del rendimiento diagnóstico

Del total de muestras, se presentaron 74 (14,77%) muestras discordantes en mínimo un ensayo, el 45,9% (n=34) fueron falsos negativos y el 54,1% (n=40) fueron falsos positivos. En la Tabla 11 y 11A se describen los falsos negativos y en la Tabla 12 y 12A los falsos positivos.

Tabla 11. Tasa de falsos negativos y muestras relacionadas

Técnicas evaluadas	Vircell Chagas Elisa IgG	BiosChile Test Elisa Chagas III	Wiener Chagatest v4.0	Abbott Architect Chagas	Biokit BioELISA Chagas	DiaPro T. cruzi Ab	Tecnosuma Umelisa Chagas
Total Falsos negativos	0,39%	0,78%	1,17%	1,56%	1,95%	4,30%	7,42%
Una (1) muestra fue un FN en 6 técnicas diferentes	A	A	A	A	A		A
Una (1) muestra fue un FN en 3 técnicas diferentes				B		B	B
Una (1) muestra fue un FN en 3 técnicas diferentes				C	C		C
Una (1) muestra fue un FN en 2 técnicas diferentes					D		D
Una (1) muestra fue un FN en 2 técnicas diferentes				E			E
31 muestras fueron FN solo en una (1) técnica		1 (X)	2 (X)		2 (X)	10 (X)	14 (X)
Total	1	2	3	4	5	11	19

FN: falso negativo

Cada letra (A, B, C, D, E) indican una muestra diferente, las características de esos pacientes se encuentran en la 11A.

(X) indica discrepancia solo en esa técnica

Fuente: Autores, elaborado con base en resultados de rendimiento diagnóstico.

Tabla 11A. Características de los pacientes con muestras falsos negativos

Muestra	Estado de la infección	Pruebas adicionales	Procedencia Departamento	Sexo	Edad (años)	Condición clínica
A	41 días post infección	InmunoBlot POS PCR POS	Casanare	Femenino	33	Sintomática
B	Crónico con fase aguda documentada, 403 días post infección	InmunoBlot POS Gota Gruesa POS	Casanare	Masculino	62	Sintomático
C	60 días post infección	InmunoBlot POS Gota Gruesa POS	Meta	Femenino	61	Sintomática
D	Crónico con fase aguda documentada, 403 días post infección	InmunoBlot POS Gota Gruesa POS	Casanare	Masculino	38	Sintomático
E	Consultante con sospecha de la infección	Ninguna	Casanare	Masculino	Sin dato	Sin dato

Fuente: Autores, elaborado con base en resultados de rendimiento diagnóstico.

Tabla 12. Tasa de falsos positivos y muestras relacionadas

Técnicas evaluadas	BiosChile Test Elisa Chagas III	Wiener Chagatest v4.0	Abbott Architect Chagas	Vircell Chagas Elisa IgG	Tecnosuma Umelisa Chagas	DiaPro T. cruzi Ab	Biokit BioELISA Chagas
Total Falsos positivos	2,04%	2,04%	2,04%	2,45%	2,45%	2,86%	5,31%
Una (1) muestra fue un FP en 4 técnicas diferentes		A	A	A		A	
Una (1) muestra fue un FP en 3 técnicas diferentes		B	B			B	
Una (1) muestra fue un FP en 2 técnicas diferentes					C	C	
Una (1) muestra fue un FP en 2 técnicas diferentes	D				D		
38 muestras fueron FP solo en una (1) técnica	4 (X)	3 (X)	3 (X)	5 (X)	4 (X)	4 (X)	13 (X)
Total	5	5	5	6	6	7	13

FP: Falso positivo

Cada letra (A, B, C, D) indican una muestra diferente, las características de esos pacientes se encuentran en la 12A.

X indica discrepancia solo en esa técnica

Fuente: Autores, elaborado con base a resultados de rendimiento diagnóstico.

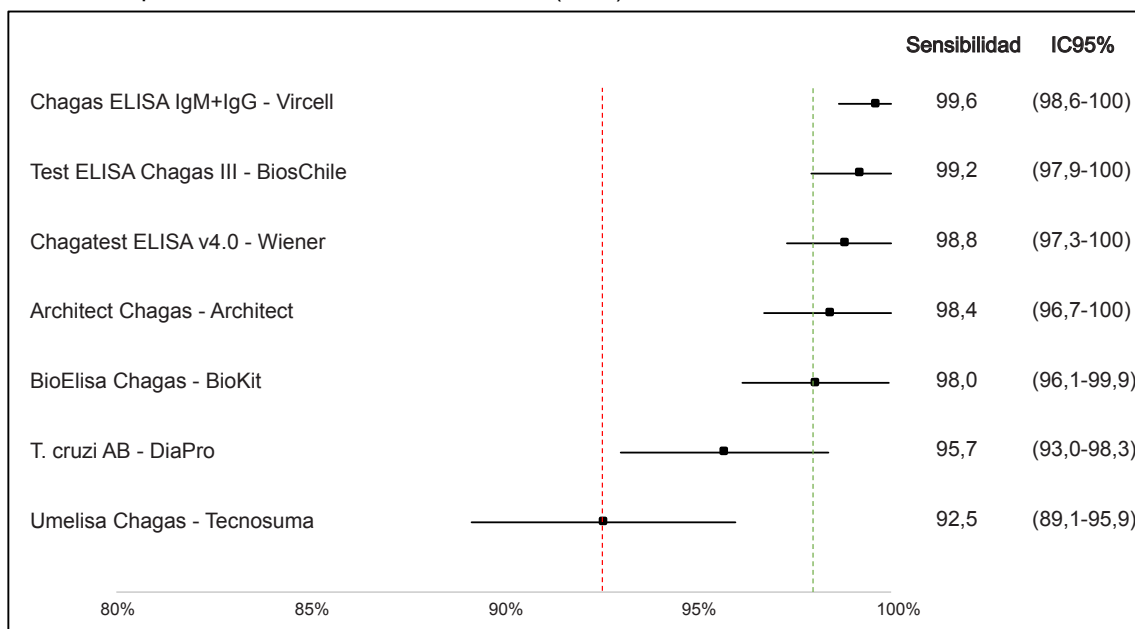
Tabla 12A. Características de los pacientes con muestras falsos negativos

Muestra	Paciente	Pruebas adicionales	Procedencia	Sexo	Edad (años)	Condición
A	Consultante con sospecha de la infección	Ninguna	Cundinamarca	Masculino	33	Asintomático
B	Donante	Inmunoblot NEG	Bogotá	Sin dato	Sin dato	Sin dato
C	Consultante con sospecha de la infección	Inmunoblot NEG	Boyacá	Femenino	Sin dato	Sin dato
D	Consultante con sospecha de la infección	Ninguna	Cundinamarca	Masculino	26	Asintomático

Fuente: INS. LNR. Parasitología. Elaborado con base a las bases de datos de la vigilancia por laboratorio.

La sensibilidad y la especificidad de las técnicas evaluadas frente al patrón de referencia se muestran en la Figura 6 y 7 respectivamente, junto con los intervalos de confianza al 95% (IC95%), las características operativas adicionales como exactitud, valores predictivos y razones de verosimilitud se muestran en el Anexo 4.

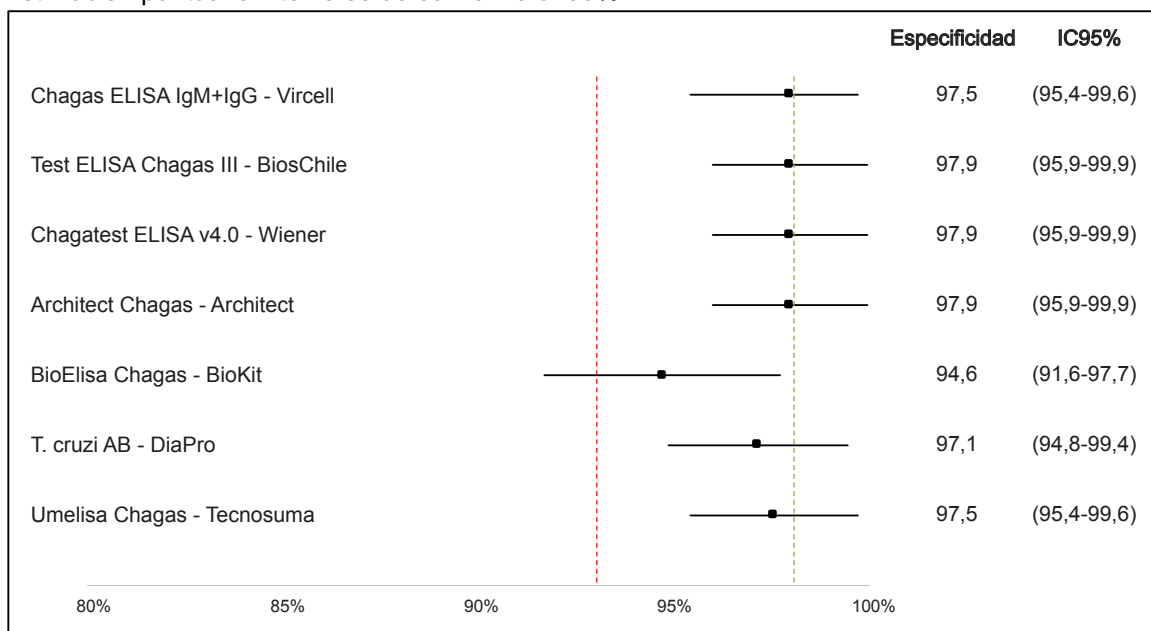
Figura 6. Sensibilidad de técnicas ELISA
Estimación puntual e intervalo de confianza al (95%)



Línea punteada roja (92,5%): sensibilidad mínima para considerar una técnica con desempeño diferente al patrón de referencia.
Línea punteada verde (98%): corresponde al desempeño máximo en que una prueba logra alcanzar resultados concluyentes, de acuerdo a consenso de expertos a nivel internacional (28).

Fuente: Autores, elaborado con base en los resultados del procesamiento de datos.

Figura 7. Especificidad de técnicas ELISA
Estimación puntual e intervalos de confianza al 95%



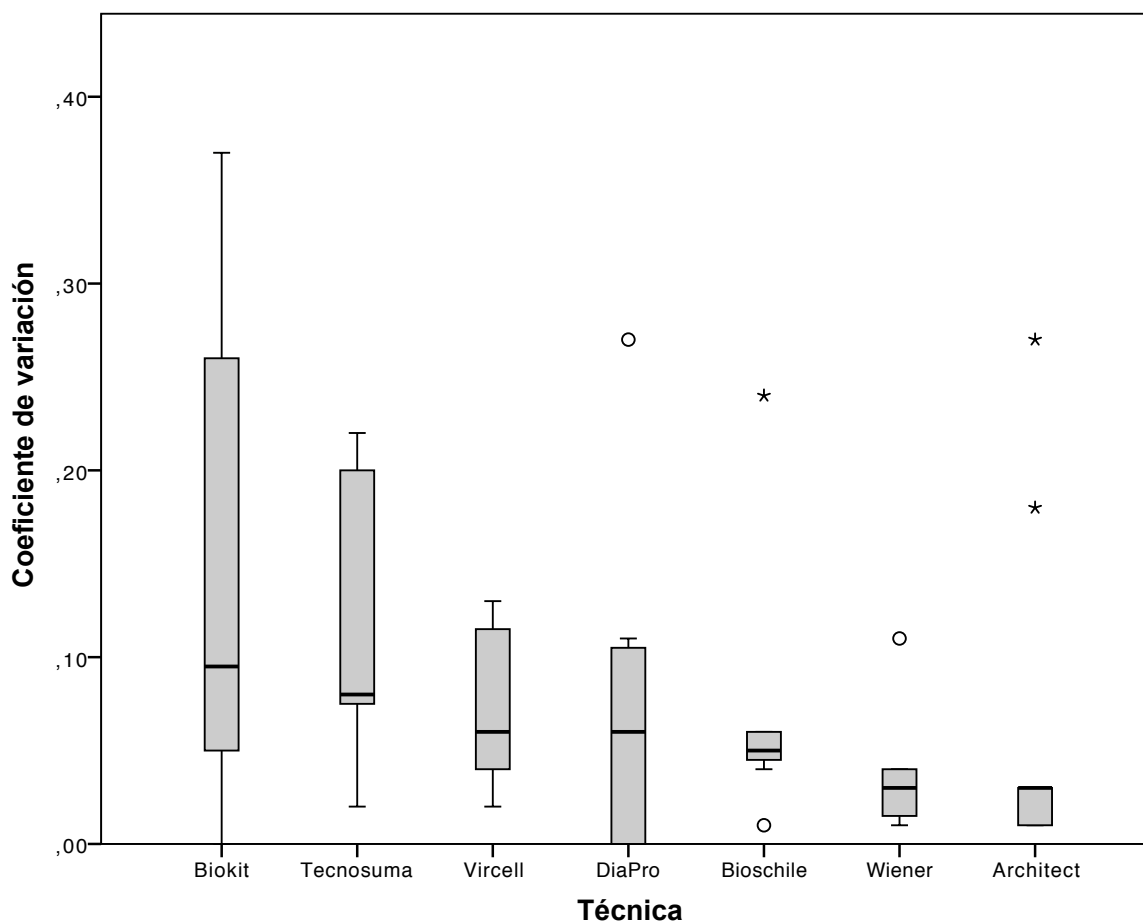
Línea punteada roja (93%): especificidad mínima para considerar una técnica con desempeño diferente al patrón de referencia.
Línea punteada verde (98%): corresponde al desempeño máximo en que una prueba logra alcanzar resultados concluyentes, de acuerdo a consenso de expertos a nivel internacional (28).

Fuente: Autores, elaborado con base en los resultados del procesamiento de datos.

7.2. PRUEBA DE REPETIBILIDAD

Se procesaron diez muestras cada una con tres replicas, para un total de 30 datos por técnica, fueron realizados análisis de repetibilidad en muestras positivas y negativas. En la Figura 8, se describen los coeficientes de variación de las muestras positivas.

Figura 8. Coeficientes de variación de técnicas ELISA con muestras positivas



° Datos atípicos

* Datos extremos

CV: coeficientes de variación

Fuente: Autores, elaborado con base en los coeficientes de variación de muestras positivas.

7.3. CARACTERÍSTICAS OPERATIVAS DE TÉCNICAS EN BINOMIOS

Se estimaron a través de un análisis de pruebas múltiples, las características operativas de los diferentes binomios, teniendo en cuenta dos escenarios diferentes. El primero en serie (una prueba después de un resultado positivo en la prueba inicial) utilizando como primera prueba la de antígenos totales que constituye

la primera alternativa para ser considerada como la técnica de tamización y con la de péptidos sintéticos, teniendo en cuenta que esta prueba es utilizada como prueba de tamización en gran parte de los LDSP en Colombia y la segunda en paralelo teniendo en cuenta siempre la técnica de antígenos totales (Anexo 5).

7.4. PREDICCIONES DEL DESEMPEÑO DE LOS BINOMIOS

Con el objetivo de interpretar los resultados de las características operativas de las técnicas en binomios con números absolutos, se realizó un análisis de predicciones de su desempeño, basado en:

- Población establecida de 10.000 habitantes
- Escenario de diferentes prevalencias determinadas: (1%, 10%, 20% y 40%).

Se presenta en la Tabla 14, la información relacionada con las predicciones de prevalencia del 1% de cada una de las combinaciones o binomios en serie, tomando tres técnicas iniciales o de tamizaje, Test ELISA Chagas III[®] (BiosChile) de antígenos totales considerada como la primera elección para el tamizaje, Umelisa Chagas[®] (Tecnosuma) de un principio antigénico diferente con péptidos sintéticos por ser de uso frecuente en el país en Laboratorios de Salud Pública en actividades de intervenciones colectivas y Chagas ELISA IgM+IgG[®] (Vircell) por evaluar el uso de antígenos recombinantes como posible técnica de tamizaje.

Como técnicas complementarias o de confirmación (segunda prueba) se incluyen las restantes de antígenos diferentes a la primera y finalmente se suma la utilización de una tercera prueba, en este caso la IFI, de acuerdo a la recomendación para dirimir discrepancias, de un principio diferente con un desempeño estimado de sensibilidad de 94,0% y especificidad de 98,0%. Se amplían los resultados, con prevalencias del 10%, 20% y 40% en el Anexo 6.

La Tabla 15 contiene los resultados de las combinaciones en paralelo entre la prueba Test ELISA Chagas III[®] (BiosChile) con cada una de las técnicas de antígenos diferentes, se incluye nuevamente la utilización de la tercera prueba (IFI) para dirimir las discrepancias, con un desempeño estimado de sensibilidad de 94,0% y especificidad de 98,0%.

Tabla 13. Predicciones en serie del comportamiento de pruebas ELISA
Población 10.000 habitantes
Prevalencia 1%
Enfermos 100

Desempeño	Primera prueba					
	Antígenos totales (BiosChile)			Péptidos sintéticos (Umelisa)		
				Antígenos recombinantes (Vircell)		
Falsos positivos	202			243		
Falsos negativos	1			7		
Sometidos a segunda ELISA	301			336		
infectados captados	99			93		
				100**		
Segunda prueba	FP ²	FN ²	Disc	FP ²	FN ²	Disc
Architect	4	2	200	5	1	239
Biokit	11	2	193	13	2	232
DiaPro	6	4	200	7	4	240
Umelisa	5	7	204	-	-	-
Vircell	5	0	197	6	0	237
Wiener	4	1	199	5	1	239
BiosChile	-	-	-	5	1	239
Después de tercera prueba ^{&}	FP ³	FN ³		FP ³	FN ³	
Architect	8	1		10	7	
Biokit	15	1		18	7	
DiaPro	10	1		12	7	
Umelisa	9	1		-	-	
Vircell	9	1		11	7	
Wiener	8	1		10	7	
BiosChile	-	-		10	7	
Seropositivos captados	99% a 99.99%			93%		
				100%		

* Es posible que se presente algún falso negativo

**Es posible que no sean detectados todos los infectados

FP: Falsos positivos

FN: Falsos negativos

² Cifras basadas en resultados después de aplicar la primera y segunda prueba ELISA

Disc: Discrepancias entre primera y segunda prueba ELISA

[&] La tercera prueba utilizada es la Inmunofluorescencia indirecta

³ Estimadores basados después de aplicar tres pruebas

Fuente: Autores, cálculos propios con base en estimación de predicciones en serie

Tabla 14. Predicciones en paralelo del comportamiento de pruebas ELISA
Población 10.000 habitantes
Prevalencia 1%
Enfermos 100

Binomio de pruebas	Positivos ²	Negativos ²	FP ²	FN ²	Discrepancias ^E	FP ³	FN ³	%
BiosChile + Architect	102	9500	4	0	399	12	0	99,99%
BiosChile + Vircell	104	9460	5	0	436	14	0	99,99%
BiosChile + DiaPro	101	9421	6	0	478	15	0	99,99%
BiosChile + Wiener	102	9500	4	0	398	12	0	99,99%
BiosChile + Biokit	108	9183	11	0	709	25	0	99,99%
BiosChile + Umelisa	97	9460	5	0	443	14	0	99,99%

² estimadores basados en resultados después de aplicar las dos pruebas de ELISA

^E: cifra estimada del número de discrepancias entre las dos primeras ELISA y deben ser remitidos para aplicar tercera prueba de IFI para confirmación

³ estimadores basados en resultados después de aplicar tres pruebas

% Porcentaje de seropositivos detectados

Fuente: Fuente: Autores, cálculos propios con base en estimación de predicciones en paralelo

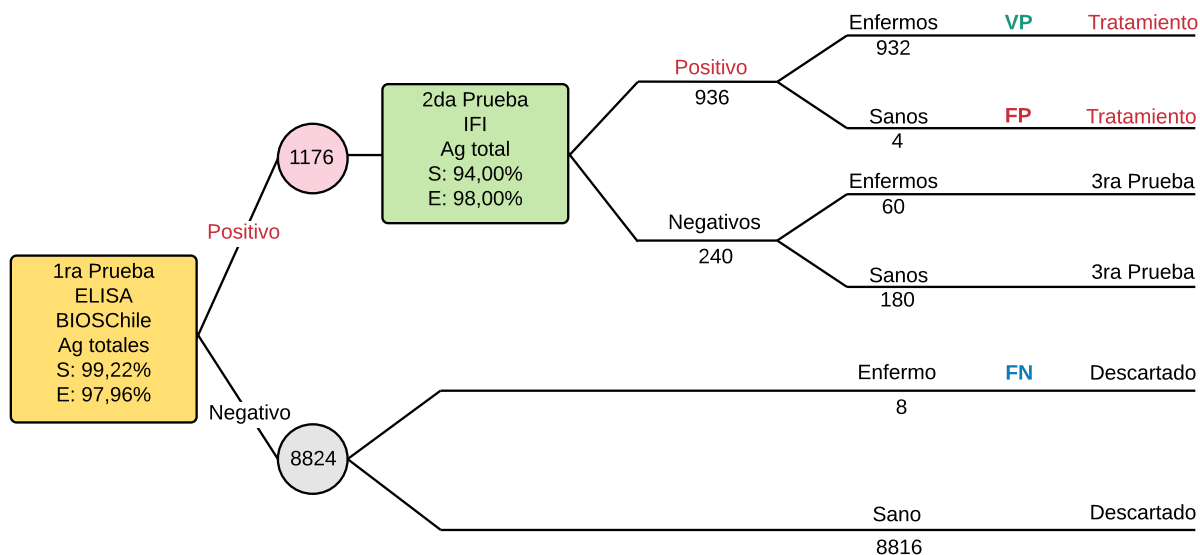
Con base en los resultados de las predicciones y en lo observado en el desempeño de las técnicas de ELISA comerciales, se pueden comparar los dos algoritmos para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas:

El primero (Figura 9), el algoritmo clásico donde la segunda prueba de confirmación es una prueba de IFI (S: 94,0%; E: 98,0%).

El segundo (Figura 10) algoritmo propuesto en el estudio, donde la segunda prueba de confirmación es una ELISA de antígenos recombinantes, para el ejemplo se tomó la S (98,83%) y E (97,96%) de la técnica de Wiener.

La comparación entre estos dos algoritmos se condensa en la Tabla 16.

Figura 9. Algoritmo serológico clásico: ELISA antígenos totales seguido por IFI



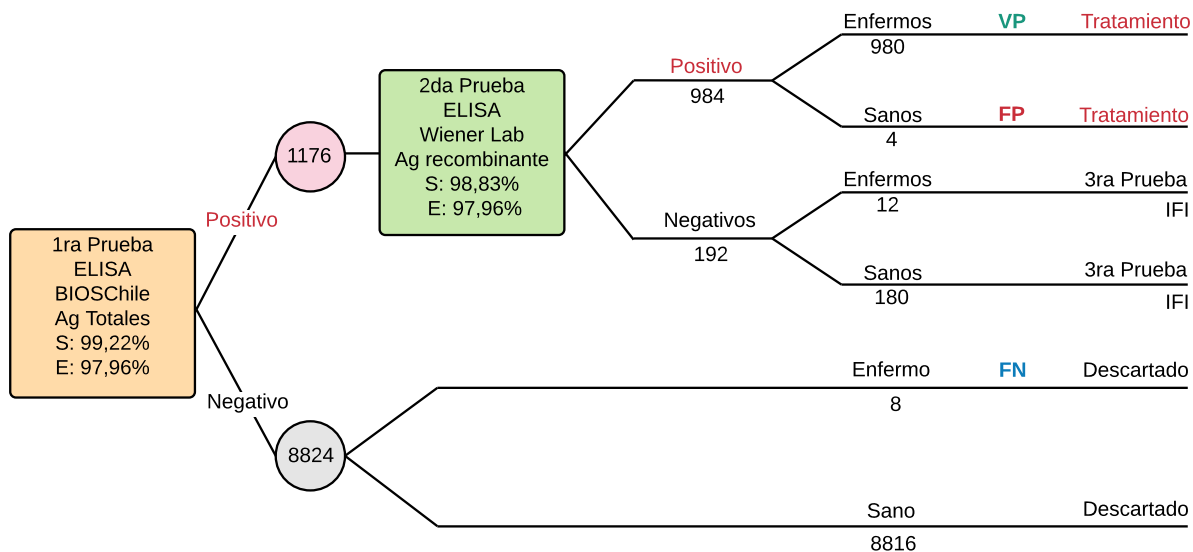
VP: Verdaderos positivos

FP: Falsos positivos

FN: Falsos negativos

Fuente: Autores, elaborado con base en las predicciones del comportamiento del algoritmo clásico.

Figura 10. Nuevo algoritmo serológico: ELISA antígenos totales seguido por ELISA antígenos recombinantes



VP: Verdaderos positivos

FP: Falsos positivos

FN: Falsos negativos

Fuente: Autores, elaborado con base en las predicciones del comportamiento del algoritmo clásico.

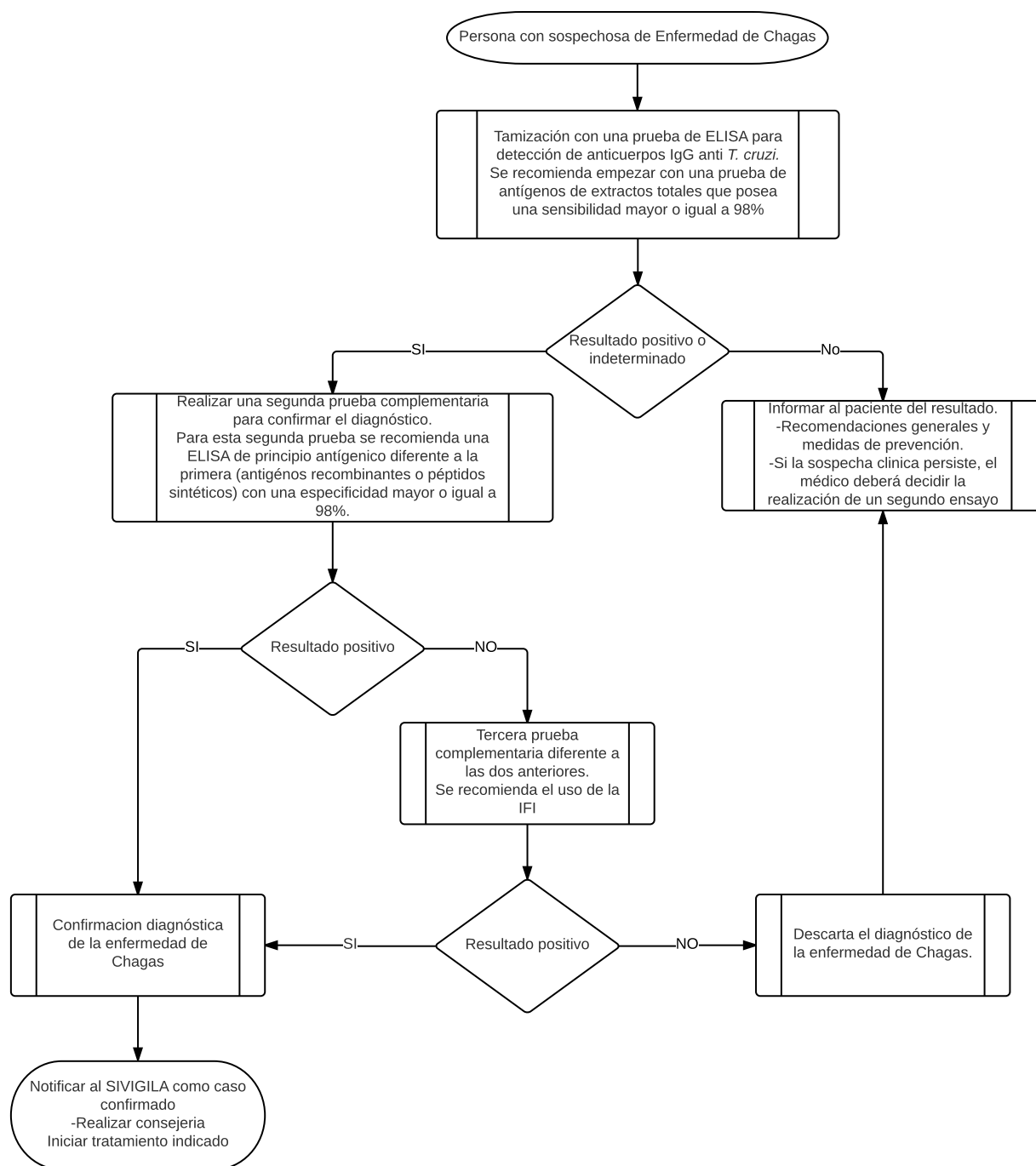
Tabla 15. Resultados de comparación de algoritmo clásico y algoritmo nuevo

Uso del Algoritmo clásico (Figura 9)	Uso del Nuevo algoritmo (Figura 10)
Pacientes positivos en primera prueba de ELISA (1176) para posteriormente realizar IFI que constituye la segunda prueba o de confirmación en este algoritmo.	Los (1176) pacientes positivos en primera prueba de ELISA (antígenos totales), se tendrían que pasar a segunda prueba de ELISA (antígenos recombinantes) y no a IFI.
Al procesar la IFI, menor número de pacientes verdaderos positivos (932) para someter a tratamiento.	Al procesa la segunda ELISA, mayor número de pacientes verdaderos positivos para someter a tratamiento (980), en total se captarían 48 pacientes más.
Al procesar la prueba de IFI, se obtendría mayor número de pacientes con pruebas discordantes para tercera prueba (240)	Al procesar las segunda ELISA, menor número de pacientes con pruebas discordantes para tercera prueba (192), en total 48 pacientes menos que en el algoritmo clásico.
	El procesamiento de pruebas de IFI, que corresponde a la tercera prueba en este algoritmo se disminuiría a 192, en total 984 menos pruebas de IFI que en algoritmo clásico.

Fuente: Autores, elaborado con base a resultados de evaluación de rendimiento.

Una vez obtenidos todos los resultados descritos anteriormente, se diseñó como una nueva propuesta para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas, el algoritmo donde se utiliza como primera técnica de tamización una ELISA de antígenos totales, como segunda prueba de confirmación una ELISA de antígenos recombinantes o péptidos sintéticos y como tercera prueba en caso de discordancias entre estas dos ELISA, la técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) (Figura 11).

Figura 11. Algoritmo de diagnóstico serológico propuesto para la Enfermedad de Chagas en Colombia



Fuente: INS. Ministerio de Salud y Protección Social. DNDi. 2016.

8. DISCUSIÓN

Los métodos serológicos siguen siendo los principales métodos que se utilizan para determinar la infección por *T.cruzi* en fase crónica, esto debido a la disminución significativa y presencia intermitente de parásitos en sangre. La técnica de ELISA ha sido desde los años 70, la de mayor uso para el diagnóstico serológico de la enfermedad, esta busca detectar la presencia de anticuerpos de tipo IgG que son inducidos por el hospedero gracias a los antígenos presentes en el parásito, la respuesta inmunológica permanece a lo largo de muchos años permitiendo que estos sean detectados en la mayoría de los pacientes infectados (1,2,6,28,70).

Las técnicas de ELISA han sido fabricadas con diferentes tipos de antígenos, mostrando ventajas o desventajas según lo que se desee obtener, son utilizados los parásitos completos de cepas de epimastigotes de *T.cruzi* mediante cultivo, para elaborar los llamados antígenos totales, extractos totales o completos, compuestos por mezclas complejas de proteínas, la mayoría de una composición desconocida, pero con una gran cantidad de determinantes antigénicos que pueden ser reconocidos por la mayoría de los anticuerpos expresados por los pacientes infectados (6,17,70,71). Sin embargo, han demostrado ciertas dificultades en términos de especificidad, llevando en ocasiones a resultados falsos positivos por reacciones cruzadas con *T.rangeli* y *Leishmania sp.* e inclusive en algunas enfermedades autoinmunes (13,70).

En este estudio, la técnica Test ELISA Chagas III® (GrupoBios S.A, Santiago, Chile) de extractos totales, demostró uno de los mejores desempeños en términos de sensibilidad 99,22% (IC95% 97,94 -100) y especificidad 97,96% (IC95% 95,98-99,93), muy similar a lo que se encontró en el estudio de Caballero et al., 2007, en pacientes brasileños con una sensibilidad del 100% (IC95% 94.5 – 100) y especificidad 90,30% (IC95% 84,3 -94.5), incluyendo pacientes con infección por otros agentes como *Leishmania sp.* y *T.rangeli* (72).

En el estudio de Flores-Chávez et al., 2009, se obtuvo en muestras de pacientes latinoamericanos sintomáticos, asintomáticos y con resultados de pruebas parasitológicas, una sensibilidad del 100% (IC95% 99,2 – 100) y especificidad 84,1% (IC95% 78,00-90,1), lo anterior evidencia, al igual que en este estudio la capacidad inicial que tienen los antígenos totales de detectar pacientes infectados teniendo en cuenta que además fueron pacientes aun sin presentación de sintomatología (73) .



Por otra parte, la OMS en el 2010 en su análisis de rendimiento diagnóstico de pruebas inmunoserológicas, evidenció en esta misma prueba, sensibilidad de 99.40% (IC95% 91.2 - 98.1) y especificidad 99.61% (IC95% 97.9–100), encontrándose por el contrario que esta técnica podría ofrecer una mejor especificidad que sensibilidad, así como también lo evidenció Remesar et al. 2009, que obtuvo sensibilidad de 95.6% (IC95% 93.3–97.9) y especificidad 99.8% (IC95% 99.2–100.0), lo cual es contrario a lo esperado con las técnicas de extractos totales que buscan una mejor sensibilidad (75). Es importante destacar que la población utilizada por la OMS, fue obtenida de Bancos de Sangre de referencia de diez países de América Latina y la utilizada por Remesar, fue población de donantes reclutados en la provincia del Chacho, Noreste de Argentina (74,75).

El estudio de Añez et al., 2010, realizado en Venezuela muestra un desempeño significativamente menor a los anteriores, sensibilidad de 85% y especificidad de 82%, sin embargo, este estudio fue realizado con una pérdida controlada de la reactividad del antígeno con cambios cortos de temperatura, mostrando sensibilidad y especificidad del 100% antes de iniciar la degradación del antígeno. Si bien el estudio de Añez iba dirigido a responder otra pregunta de investigación, la cual era relacionada con el tiempo necesario para la degradación del antígeno, previamente se levantó una línea base de su rendimiento, la cual es similar a la detectada en el presente estudio (76).

Glender et al., 2015, realizó un estudio comparando varios métodos inmunoserológicos para el tamizaje de la enfermedad de Chagas en diferentes bancos de sangre en Argentina, probando simultáneamente siete técnicas con 190 muestras de suero, buscando identificar la mejor técnica para el tamizaje y las mejores como segunda y tercera prueba, los resultados mostraron sensibilidad del 92,59% (IC95% 82,71-100) y especificidad del 93,83% (IC95% 90,12-97,53) en la técnica de BiosChile y aunque el desempeño en su estimación puntual fue menor que en este estudio, los intervalos de confianza superiores muestran un desempeño similar; una de las razones posibles puede ser la diferencia en la respuesta inmune de las poblaciones de Argentina y Colombia, ya que están expuestas a diferentes DTUs del parásito (20,21,77).

En un meta-análisis realizado por Alvarenga et al., en 2016, se encontraron dos registros en los que se obtuvo en esta misma prueba, sensibilidades del 100% y 97,7% (IC95% 90,2-99,5), y especificidades de 100% y 98,7% (IC95% 90,8-99,8), respectivamente, desempeños muy similares a los obtenidos en este estudio, sin embargo, su intervalo de confianza inferior probablemente puede evidenciar un menor desempeño. La mayoría de estos estudios corroboran la utilidad de las

técnicas convencionales de extractos totales como pruebas de alta sensibilidad, cuya utilidad como técnica de tamizaje permite con una gran capacidad discriminar a los individuos infectados de una población (78).

Otro tipo de antígenos, son los obtenidos a través de la tecnología de DNA recombinante, los cuales son inmunodominantes en infecciones humanas y provenientes de genes repetitivos a los que se les denominan regiones altamente conservadas que codifican grandes familias de proteínas del *T.cruzi* como las mucinas MASPs (Mucine Associate Surface Proteins), los antígenos citoplasmáticos CRA (Cytoplasmatic Repetitive Antigen) y flagelares FRA (Flagellar Repetitive Antigen), las cuales inducen gran cantidad de anticuerpos, permitiendo ser detectados por pruebas serológicas, caracterizando una infección reciente o pasada (6,70,71,79,80).

Los antígenos recombinantes fueron creados con el objetivo de aumentar la especificidad de la reacción inmunológica, disminuyendo la proporción de falsos positivos y mejorando la precisión diagnóstica de las pruebas (70). Sin embargo, una desventaja es que no todos los pacientes infectados sintetizan anticuerpos contra estos antígenos, por lo tanto, el uso de un solo antígeno recombinante puede dejar por fuera sueros que tienen anticuerpos contra un antígeno diferente, de tal manera que se espera que el uso de varios antígenos recombinantes detecten más pacientes con infección (6,17).

En el estudio de Levin et al., en 1991, en el Workshop del Proyecto Ibero-americano de Biotecnología se dieron pasos importantes en la detección de los antígenos con potencial utilidad en el diagnóstico serológico de la ECh (18). Desde entonces diferentes autores han utilizado distintos antígenos recombinantes para la conformación de las pruebas ELISA incluyendo la utilización de antígenos de diferentes estadios del parásito.

Teniendo en cuenta lo anterior, en este estudio se evaluaron cinco pruebas de antígenos recombinantes, la prueba Chagatest ELISA recombinante versión 4.0 (Wiener Lab. Rosario, Argentina). La versión 3.0 de esta técnica que incluye los mismos antígenos recombinantes presentó resultados similares en el estudio de Pirard et al., 2005, en población boliviana con una sensibilidad de 98,9% (IC95% 96,9-100%) y una especificidad de 98,9% (IC95% 97,6-100%), en el de Caballero et al., 2007, en población panameña con sensibilidad de 100% (IC95% 94,5-100) y especificidad de 100% (IC95% 97,8-100), en la OMS 2010, en muestras de pacientes latinoamericanos una sensibilidad de 98,8% (IC95% 95,8-99,9). Por otra parte, en el estudio de Remesar et al., 2009, en población argentina demostró una

sensibilidad menor de 95,9% (IC95% 93,7- 98,1) y especificidad de 98,3% (IC95% 97,5- 99,1), pero su intervalo de confianza superior fue mayor del 98% y la versión 4.0 en un estudio incluido en el meta-análisis de Alvarenga et al., 2016, presentó resultados similares con una sensibilidad de 100% y especificidad de 99,6% (72,75,78,81).

La prueba de Architect de Abbott, una quimioluminiscencia incluida en este estudio con una especificidad de 97,96% ha sido también evaluada por otros investigadores demostrando su buen desempeño en especificidad en tres estudios diferentes realizados durante los años 2006, 2010 y 2012 con estimaciones puntuales 100%; 98,09% y 96% respectivamente (74,78,82), lo cual indica que es una técnica que tiene un comportamiento constante en diferentes poblaciones.

Otra de las pruebas evaluadas fue la BioElisa de Biokit, en la cual se obtuvo la menor especificidad, sin embargo, en otros estudios realizados en España en los años 2009 y 2015 fueron obtenidos resultados similares e incluso menores con una especificidad 94,9% (IC95% 91,2 - 98,7) y 79,55% (IC95% 67,63 – 91,46) respectivamente, pero en el estudio de la OMS del año 2010 la especificidad fue de 99,23% (IC95% 97,3 -99,9) y en Colombia en el año 2015 el desempeño de esta prueba fue de 100% (IC95% 97-100) en 205 pacientes con sospecha de Enfermedad de Chagas (73,74,77,83).

En relación a las técnicas de Vircell (Chagas ELISA IgG+IgM) y la de DiaPro (*T. cruzi* AB) que igualmente fueron de antígenos recombinantes, no se encontraron investigaciones donde se evalué su desempeño, sin embargo, la de Vircell fue una de las 41 técnicas incluidas en el estudio colaborativo de la OMS para la validación de los estándares biológicos internacionales de la NIBSC (68).

En cuanto a todos estos estudios reportados a lo largo de los años con las técnicas recombinantes, vale la pena destacar que aunque su uso principalmente está ligado a su buen desempeño en términos de especificidad, donde la prueba debe discriminar a los individuos no infectados y los que sin estarlo, presenten otras condiciones que generen falsos positivos, la mayoría de ellas reportan también sensibilidades muy altas, como también fue evidente en el presente estudio, a pesar que estas pruebas de antígenos recombinantes incluyen una combinación de varios epítomos, que incluso suelen ser los mismos en muchas de ellas, con una posible limitación relacionada con el hecho que pueden llegar a no tener epítomos de proteínas recombinantes, los cuales no llegarían a ser reconocidos por los anticuerpos de los pacientes infectados, ya que éstos pueden estar dirigidos contra antígenos diferentes del parásito (6,73,60). Esto se puede evidenciar en el presente

estudio, ya que fueron pocas las muestras que tuvieron el mismo comportamiento en varias técnicas.

Los péptidos sintéticos, menos complejos que las proteínas, pero que también vienen siendo utilizados como antígenos en las técnicas de ELISA, constituyen una alternativa que describen algunos estudios tener un alto potencial para el desarrollo de ensayos específicos e inclusive junto con las mismas proteínas recombinantes multiepitopes pueden ser combinados demostrando alto nivel de sensibilidad y especificidad (70,84,85). Sin embargo, en este estudio la técnica de ELISA UMELISA cuyos péptidos sintéticos p17 y p18 de regiones inmunodominantes del *T.cruzi* demostró una sensibilidad de 92,52%, menor que la de las otras pruebas evaluadas, probablemente por razones entre otras como, pequeña cantidad de péptidos sintéticos, el tipo de péptidos obtenidos en la síntesis que pueden llevar únicas copias de los epítomos disminuyendo su posibilidad de reconocimiento y la pureza final de los péptidos sintetizados, mientras que los antígenos recombinantes pueden tener muchas repeticiones en sus epítomos, aumentando así su posibilidad de reconocimiento. No se conocen estudios de desempeño de esta técnica, solo el estudio mediante el cual la estandarizaron (86).

En relación a los falsos negativos obtenidos, es importante anotar que una de las muestras procedentes de un paciente con una infección por *T.cruzi* muy reciente (41 días post infección) no fue detectada por las proteínas antigénicas de seis de las siete técnicas evaluadas en este estudio, probablemente los anticuerpos presentes en esta muestra estaban dirigidos contra antígenos diferentes a las proteínas presentes en ellas, pero si se encontraban presentes en la técnica de ELISA *T.cruzi* AB de DiaPro, de la cual desafortunadamente no fue posible obtener información acerca de su antígeno y claramente estaban presentes en el antígeno de epimastigotes de la cepa de *T.cruzi* TcI de las pruebas de referencia del INS. Asimismo, esta suposición puede ser también una posible explicación para que otras tres muestras igualmente no fueran detectadas por algunas de las técnicas evaluadas (70, 71).

En cuanto a los falsos positivos, la diferencia en los resultados con las pruebas de referencia podría deberse a reacciones cruzadas por la presencia de anticuerpos contra especies de *Leishmania sp.* y con *T.rangeli*, dado que estos parásitos también son endémicos en Colombia (6,17).

La repetitividad de las técnicas evaluadas fue estimada con 3 réplicas de cada una de 10 muestras durante las corridas de cada prueba, obteniendo coeficientes de variación inferiores al 20%, indicando que son técnicas adecuadas que no cuentan

con la probabilidad de un comportamiento variable cuando su uso es desafiado con muestras que ingresan a un servicio de diagnóstico.

Otros estudios de comparación de técnicas de ELISA corroboran los resultados obtenidos en esta verificación realizada con muestras de pacientes colombianos, en donde se concluye que las técnicas de antígenos totales presentan una alta sensibilidad pudiendo ser utilizadas como métodos de tamizaje de la infección por *T.cruzi* y una combinación con una técnica basada en antígenos recombinantes o péptidos sintéticos constituye una buena aproximación de un diagnóstico final (73,77,83). De acuerdo con los criterios internacionales de la OMS mediante dos técnicas serológicas que utilizan antígenos diferentes (8).

Las técnicas de antígenos recombinantes que demostraron menor especificidad fueron aquellas que incluyen anti-IgM además de anti-IgG, siendo una característica que en lugar de ser una bondad, podría llegar a interferir con el inmunodiagnóstico, debido a la gran inmunoreactividad de esta inmunoglobulina M pentamérica (13,73,60).

Teniendo en cuenta que el *T.cruzi* es extremadamente antigénico, y a los pocos días después de la infección por cualquier vía de transmisión existe una respuesta inmune humoral muy eficaz que intenta frenar el aumento de la parasitemia, pudiéndose detectar anticuerpos frente a distintos antígenos del parásito, principalmente de tipo IgG (IgG1/gG3), un 5-10% de los casos IgM y en menor proporción IgA, a través de este estudio en el cual se determinó la respuesta inmune de IgG en muestras de suero de pacientes en fase crónica y algunos de ellos con una fase aguda documentada cuya respuesta inmune se pudo detectar a los 41 días después de la infección, se recomienda que el diagnóstico serológico tanto en pacientes con sospecha de fase crónica sintomática o asintomática, así como en pacientes con sospecha de fase aguda después de 25 y hasta 90 días post infección deberá realizarse bajo estas condiciones, mediante dos técnicas de ELISA de principio antigénico diferente (8,10,13,87).

Una gran variedad de factores influyen en el rendimiento de las pruebas para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas, factores desde el punto de vista técnico como las mismas características operacionales, como la prueba de péptidos sintéticos, en la cual se determinó una limitación técnica inherente al desarrollo de la misma, relacionada con la falta de estabilidad en la reacción final por ausencia de una solución de parada, pero por el contrario otras de ellas demostraron facilidades en su uso como, cambio de color del buffer de dilución de la muestra al contacto con el suero y menor número de reactivos a preparar en la

corrida, entre otras, esto también fue sugerido y analizado por la OMS en 2009, donde recomendó que las técnicas además de un buen desempeño analítico, deberían contar con facilidad en su aplicación y abordaje tecnológico.

Teniendo en cuenta que fueron utilizados dos estándares biológicos internacionales suministrados por la OMS (NIBCS), recomendados para la evaluación analítica de la sensibilidad de nuevas pruebas, los cuales son obtenidos a partir de regiones endémicas con alta prevalencia de TcI (09/188) y TcII (09/186), pero sin garantía que las preparaciones contenían solo linaje TcI o linaje TcII, sin embargo, aunque los sueros presentaban esta limitación, los resultados obtenidos con seis de las siete pruebas analizadas en este estudio fueron 100% concordantes con los resultados del estudio donde fueron caracterizados los sueros como positivos por 24 laboratorios y 41 ensayos diferentes (68).

Es posible entonces inferir, debido a los países de fabricación, que las diferentes técnicas son configuradas utilizando antígenos de TcI y principalmente TcII, linajes que son reconocidos por los dos tipos de sueros de referencia, lo cual probablemente evidencia que el reconocimiento antigénico depende directamente de la respuesta inmune del hospedero y no de los diferentes linajes (DTUs) con las cuales se configuran las pruebas. Algunos autores refieren que aunque la mayoría de sueros de pacientes infectados reconocen la mayoría de antígenos de *T. cruzi*, en general hay un 2% de sueros que no los reconocen, debido a que ciertos pacientes pueden no sintetizar anticuerpos contra antígenos específicos reconocidos como inmunocompetentes con respuesta humoral baja (6,17, 68).

Teniendo en cuenta que ninguna técnica alcanza por sí sola, sensibilidad y especificidad del 100%, la OMS recomienda la utilización de dos pruebas serológicas de antígenos diferentes para realizar el diagnóstico en serio o en paralelo, para lo cual en este estudio se realizó el análisis de pruebas múltiples para determinar el desempeño de las técnicas cuando son utilizadas en serie y en paralelo (1,74).

Al usar el algoritmo de diagnóstico serológico en serie, se tendrían ventajas como un menor costo en términos de reactivos, dado que solo se realizaría la segunda prueba a todos los que resultaran positivos en la primera, se simplificaría al uso de un solo equipo de laboratorio y se obtendría una mayor especificidad (menos falsos positivos), dejando la detección inicial de los pacientes solo y exclusivamente a la sensibilidad de la primera prueba. En Colombia, el proceso administrativo para la confirmación de los pacientes consistía en pruebas en serie, pero la prueba de confirmación solo podía ser autorizadas por un médico tras la interpretación del



resultado de la prueba inicial. Ahora el paciente podrá obtener el resultado de una manera más ágil, ya que a partir de la misma muestra se realizaría la segunda prueba; sin embargo, esto puede llegar a ser una desventaja o representar una barrera si el laboratorio prestador del servicio no tiene disponible el segundo ensayo.

Por otro lado, al usar el algoritmo de diagnóstico serológico en paralelo, con la obtención de los resultados de las dos pruebas al mismo tiempo, se obtendría una confirmación serológica inmediata, igualmente se simplificaría al uso de un solo equipo de laboratorio y una mayor ventaja en este caso sería el incremento de la sensibilidad con menos casos perdidos, pero, una de las desventajas sería el posible incremento de los costos en relación a los reactivos, para lo cual es necesario dirigir investigaciones específicas en economía en salud, además, el hecho que las dos pruebas no se realicen en el mismo laboratorio prestador, representaría igualmente una barrera en el acceso al sistema.

En cuanto a las gestantes, aunque no fueron incluidas en este estudio, es sabido que durante el embarazo a pesar de ser un estado fisiológico y no una enfermedad, al parecer existe una disminución discreta de la capacidad inmunológica de la madre para reaccionar no solo contra antígenos fetales, sino contra otros con los cuales ha estado previamente en contacto, a pesar de esta condición según recomendaciones de la OMS la detección de la infección puede ser realizada mediante dos pruebas diferentes (ELISA e IFI), pero de acuerdo a los hallazgos de este estudio se recomienda ser realizado mediante dos técnicas de ELISA (26).

Este estudio contribuirá a eliminar las grandes barreras identificadas en nuestro país, que limitan la atención de la enfermedad y se podrá brindar de una forma más sencilla y oportuna la atención del diagnóstico serológico a los pacientes con sospecha de Enfermedad de Chagas.

Los resultados de este estudio tienen un gran impacto para la salud pública de nuestro país, dado que otorgo las bases que permitieron rediseñar el algoritmo de diagnóstico serológico para pacientes con sospecha de Enfermedad de Chagas con el uso de dos técnicas de ELISA de principio antigénico diferente, reemplazando la prueba complementaria de IFI que durante muchos años confirmaba la infección y representó una gran barrera en el acceso al diagnóstico de esta enfermedad.

El cambio del algoritmo diagnóstico permitirá inicialmente acceder a una confirmación diagnóstica en menos tiempo, tradicionalmente el proceso de tamizaje y confirmación con las pruebas realizadas por el INS y el transporte de la misma y de los resultados podría tardar alrededor de 90 días, ahora la confirmación de un

paciente sospechoso no tardará más de 30 días, lo cual presenta un beneficio mayor para el paciente y para el posible inicio de su tratamiento antitripanocida. Se disminuirán los costos de envío de muestras, adquisición de equipos y reactivos costosos y mantenimientos preventivos, de igual forma se ampliará la cobertura del diagnóstico serológico y por ende más personas podrán ser diagnosticadas y tratadas oportunamente.

El presente trabajo de evaluación de algunas técnicas de inmunoensayo de gran uso en los laboratorios y bancos de sangre de Colombia, permiten al Ministerio de Salud y Protección Social viabilizar de manera adecuada y con el principio de oportunidad 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 caracterizar serológicamente los pacientes de manera correcta, sin dejarlos con pruebas inconclusas o pendientes.

LIMITACIONES

1. En el estudio no fue posible incluir muestras caracterizadas serológicamente como positivas para anticuerpos anti-*Leishmania* y anti-*T.rangeli* principalmente como agentes parasitarios que pueden llegar a generar posibles reacciones cruzadas con el diagnóstico serológico de la Enfermedad de Chagas. Las muestras de suero con anticuerpos anti-*Leishmania* son escasas en la seroteca del LNR de Parasitología del INS, cuyos volúmenes son generalmente inferiores a 250 μ l, con el cual no era posible realizar las corridas de la totalidad de las siete técnicas evaluadas y la seroteca además carece de muestras anti-*T.rangeli* para estudios de este tipo.

Claramente se identifica esta limitación ya que hubiese sido un dato muy importante, teniendo en cuenta que Colombia posee zonas endémicas de Leishmaniasis y según la literatura puede existir también una coinfección de *T.cruzi* con *T.rangeli*.

Sin embargo, teniendo en cuenta que el estudio corresponde a una validación secundaria o proceso de verificación de las características operativas de las técnicas de ELISA, en la cual no es necesario su inclusión, como si sucede con la validación primaria de las técnicas, en las que debió ser necesario incluir este tipo de muestras entre otras, para determinar posibles reacciones cruzadas y poder iniciar su proceso de comercialización.

2. En este estudio no fueron incluidas como un subgrupo, muestras de suero a partir de población gestante como criterio de inclusión. Sin embargo, el embarazo o gravidez es un estado considerado como fisiológico, las mujeres embarazadas hacen parte de la población general siempre y cuando no tengan adicionalmente una condición patológica y los resultados de este estudio son extrapolables a toda la población general con sospecha de infección de *T.cruzi*.

Sin embargo, teniendo en cuenta que durante el embarazo puede llegar a generarse un estado de supresión inmunológica para que el cuerpo no rechace al feto como un cuerpo extraño, sería conveniente en un futuro realizar un estudio en esta población y determinar una posible diferencia en la capacidad operativa de las técnicas de ELISA o por el contrario corroborar que su estado fisiológico no interfiere en los resultados como sí puede llegar a presentarse un falso negativo en los pacientes inmunocomprometidos por estados patológicos o con uso de inmunosupresores.

3. Finalmente, con relación al tamaño de la muestra del estudio, se presentó una limitación, la cual estuvo definida en gran parte al número de estuches o kits de técnicas ELISA disponibles y que fueron donados por parte de los fabricantes o proveedores de las casas comerciales, los cuales a través de una convocatoria abierta y voluntaria participaron del estudio con un número determinado de kits.

Sin embargo, el diseño estadístico del tamaño de la muestra fue el adecuado para este tipo de estudios de hipótesis de no inferioridad. Adicionalmente, proporciones de sensibilidad inferiores a la sensibilidad mínima establecida de 92,5% e inferiores a la especificidad mínima establecida de 93,0% en el muestreo, no se esperaban en los resultados, dado que corresponderían a técnicas inapropiadas para definir un inmunodiagnóstico de la Enfermedad de Chagas y aunque para ser comercializadas en Colombia éstas técnicas de ELISA no pasan por un proceso de verificación, sí reciben un registro sanitario otorgado por el INVIMA que está condicionado por la presentación de requisitos de estudios de validación primaria.

9. 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 11).

Sin embargo, es importante tener en cuenta los resultados obtenidos en este estudio, en términos de sensibilidad ya que la prueba de péptidos sintéticos, según el diseño del estudio demostró un desempeño inferior a las técnicas utilizadas como patrón de referencia, con relación en la especificidad, una de las técnicas de antígenos recombinantes también evidencio tener un desempeño menor a las técnicas de referencia.

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 la recomendación técnica emitida por el LNR del INS (Anexo 7).

La decisión de la utilización de estas técnicas en serie o en paralelo, depende fundamentalmente del contexto donde se requiera su uso y de los conocimientos previos de la población a estudiar, pues bien, si se requiere alta sensibilidad es importante sugerir el uso en paralelo, pero si por el contrario se requiere poder



confirmar más pacientes en una zona de alta prevalencia, se podría sugerir el uso en serie.

El uso de este nuevo algoritmo basado en pruebas de ELISA, 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 necesiten 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.

Este estudio de validación secundaria permite al Ministerio de Salud y Protección Social dar vía al proceso diagnóstico de la Ruta de Atención Integral en Salud de la Enfermedad de Chagas, en donde tanto prestador como asegurador tendrán herramientas suficientes para realizar el tamizaje inicial y la confirmación en cualquier laboratorio clínico de su red de mediana y alta complejidad.

Es importante estimular la investigación aplicada y dirigirla a facilitar el acceso a las pruebas diagnósticas, sin embargo, los procesos previos con relación a la sospecha de la enfermedad por parte del personal médico, también es un aspecto claro a profundizar. Además, es una necesidad para el país ampliar las herramientas y el número de las técnicas diagnósticas validadas por las entidades de referencia para que los laboratorios clínicos de bajo, mediano y alto nivel de complejidad, además de los laboratorios de salud pública departamentales y bancos de sangre puedan elegir y trabajar con la técnica que sea más acorde a su entorno científico y operativo.

REFERENCIAS

1. World Health Organization. Control de la Enfermedad de Chagas. WHO Serie de Informes Técnicos 2002. Vol. 905. 2002.
2. Bern C, Longo DL. Chagas' Disease. *N Engl J Med*. 2015;373(5):456–66.
3. Molina I, Salvador F, Sánchez-Montalvá A. Actualización en enfermedad de Chagas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016;34(2):132–8.
4. World Health Organization. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. 2008;21(83):421–8.
5. Cucunubá ZM, Okuwoga O, Basáñez M-G, Nouvellet P. Increased mortality attributed to Chagas disease: a systematic review and meta-analysis. *Parasit Vectors*. 2016;9(1):42.
6. Brener Z, Andrade ZA, Barral-Netto M. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Second. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan SA; Nova Guanabara. 2000.
7. Hernández C, Cucunubá Z, Flórez C, Olivera M, Valencia C, Zambrano P, et al. Molecular Diagnosis of Chagas Disease in Colombia : Parasitic Loads and Discrete Typing Units in Patients from Acute and Chronic Phases. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(9):1–20.
8. Roca Saumell C, Soriano-Arandes A, Solsona Díaz L, Gascón Brustenga J. Documento de consenso sobre el abordaje de la enfermedad de Chagas en atención primaria de salud de áreas no endémicas. Vol. 47, Atención Primaria. SEGO; 2015.
9. Instituto Nacional de Parasitología “Dr Mario Fatale Chabén”. Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación. Normas para el Diagnóstico de la Infección por *Trypanosoma cruzi*. 2012.
10. Instituto Nacional de Parasitología “Dr Mario Fatale Chabén”. Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación. Guía para la atención al paciente infectado con *Trypanosoma cruzi*. Argentina; 2012.
11. Pinto A, da Silva Valente S, da Costa Valente V, de Melo Figueiras AC. Enfermedad de Chagas congénita por infección aguda maternal por *Trypanosoma cruzi* transmitida vía oral. *Rev Panam salud pública*. 2011;2(1):89–94.
12. Dias JCP, Ramos Jr. AN, Gontijo ED, Luquetti A, Shikanai-Yasuda MA, Coura JR, et al. 2 nd Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016;49(December):3–60.
13. Boes M. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Mol Immunol*. 2001;37(18):1141–9.
14. Rassi Jr A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*. 2010;375(9723):1388–402.
15. Quevedo C I. Comparacion de las reacciones de Machado Guerreiro y aglutinacion de particulas de latex en el diagnóstico serologico de la Enfermedad de Chagas. *Kasmera*. 1980;8(1):79–87.
16. Guhl F. Reporte sobre la Enfermedad de Chagas. TDR/SWG/09. Buenos Aires; 2005.
17. Telleria J, Tibayrenc M. American Trypanosomiasis Chagas disease. *One Hundred*



- Years of Research. First Edit. Elsevier. USA; 2010.
18. Levin M, Franco da Silveira J, Frasch A, Camargo M. Recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens and Chagas ' disease diagnosis : analysis of a workshop. FEMS Microbiol Immunol. 1991;89:11–9.
 19. Guhl F. Memorias del Primer Taller Internacional sobre el Control de la Enfermedad de Chagas. Universidad de los Andes. 2005.
 20. Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104(7):1051–4.
 21. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. Infect Genet Evol. 2012;12(2):240–53.
 22. Sánchez L V., Bautista DC, Corredor AF, Herrera VM, Martínez LX, Villar JC, et al. Temporal variation of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in asymptomatic Chagas disease patients. Microbes Infect. 2013;15(10–11):745–8.
 23. Llano M, Pavía PX, Flórez AC, Cuéllar A, González JM, Puerta Bula CJ. Evaluación preliminar de la prueba comercial Chagas (*Trypanosoma cruzi*) IgG-ELISA ® en individuos colombianos. Biomédica. 2014;34:228–36.
 24. Cucunubá ZM, Flórez AC, Cárdenas Á, Pavía P, Montilla M, Aldana R, et al. Prevalence and risk factors for chagas disease in pregnant women in Casanare, Colombia. Am J Trop Med Hyg. 2012;87(5):837–42.
 25. Luquetti AO, do Nascimento Tavares SB, da Rocha Siriano L, de Oliveira RA, Campos DE, de Moraes CA, et al. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in central Brazil. A study of 1,211 individuals born to infected mothers. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015;110(3):369–76.
 26. Carlier Y, Torrico F, Sosa-Estani S, Russomando G, Luquetti A, Freilij H, et al. Congenital chagas disease: Recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women. PLoS Negl Trop Dis. 2011;5(10):3–6.
 27. Cucunubá ZM, Valencia-Hernández CA, Puerta CJ, Sosa-Estani S, Torrico F, Cortés JA, et al. Primer consenso colombiano sobre Chagas congénito y orientación clínica a mujeres en edad fértil con diagnóstico de Chagas. Infectio. 2014;18(2):50–65.
 28. 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.
 29. OIE. Principios de validación de las pruebas de diagnóstico para las enfermedades infecciosas. Man pruebas diagnóstico para los Anim acuáticos. 2006;11–24.
 30. OIE. Principios y Métodos de Validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas. In: Manual Acuático de la OIE 2012. 2012. p. 20.
 31. López M, Duque S, Orozco LC, Camargo D, Gualdrón L, Cáceres E, et al. Inmunodiagnóstico de la infección chagásica por ELISA. Biomedica. 1999;19(2):153–63.
 32. Cucunubá ZM, Manne-Goehler JM, Díaz D, Nouvellet P, Bernal O, Marchiol A, et al.

- How universal is coverage and access to diagnosis and treatment for Chagas disease in Colombia? A health systems analysis. *Soc Sci Med.* 2017;175.
33. Instituto Nacional de Salud. Circular 082 de 2011. 2011.
 34. Imaz-Iglesia I, Miguel LG-S, Ayala-Morillas LE, García-Pérez L, González-Enríquez J, Blasco-Hernández T, et al. Economic evaluation of Chagas disease screening in Spain. *Acta Trop.* 2015;148:77–88.
 35. OPS. Enfermedad de Chagas [Internet]. Available from: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743&lang=es
 36. Manne-Goehler J, Reich MR, Wirtz VJ. Access to care for Chagas disease in the United States: a health systems analysis. *Am J Trop Med Hyg.* 2015;93(1):108–13.
 37. Instituto Nacional de Salud. Boletín Epidemiológico Semanal. Vol. 52, BES INS. 2016.
 38. Dib JC. Enfermedad de Chagas en las comunidades indígenas de la Sierra Nevada de Santa Marta. 2011. 66 p.
 39. Parra GJ, Florez M, Ángulo VM. Vigilancia de Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) en Colombia. Bogotá D.C: Ltda, Editorial Sic Editorial; 2015.
 40. Flórez Sánchez AC, Guasmayan L, Cortés L, Caicedo A, Beltrán M, Muñoz L. Enfermedad de Chagas y su seroprevalencia en tres departamentos de la Amazonia colombiana. *NOVA.* 2016;13(26):35–43.
 41. Presidencia de la República. Ministerio de Salud y Protección Social. Decreto 3770 de 2004.
 42. Presidencia de la República. Ministerio de Salud y Protección Social. Resolución 429 de 2016.
 43. Presidencia de la República. Ministerio de Salud y Protección Social. Resolución 3202 de 2016.
 44. Presidencia de la República. Ministerio de Salud y Protección Social. Plan Decenal de Salud Pública 2012-2021.
 45. Pinto Dias JC. Evolution of Chagas Disease Screening Programs and Control Programs Historical Perspective. *Global Heart.* 2015;10(3):193–202.
 46. World Health Organization. Accelerating Work to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases: A Roadmap for Implementation. World Health Organization. 2012.
 47. Guhl F, Auderheide A, Ramírez JD. From ancient to contemporary molecular eco-epidemiology of Chagas disease in the Americas. *Int J Parasitol.* 2014;44(9):605–12.
 48. MacPherson DW, Gushulak BD. The Travel and Tropical Medicine Manual. The Travel and Tropical Medicine Manual. 2010.
 49. Coura JR. The main sceneries of chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110(3):277–82.
 50. Kirchhoff L V. Epidemiology of American Trypanosomiasis (Chagas Disease). In: *Advances in Parasitology.* Volume 75. 2011.
 51. Rassi Jr A, Rassi A, Marcondes de Rezende J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infect Dis Clin North Am.* 2012;26(2):275–91.



52. Rueda K, Trujillo JE, Carranza JC, Vallejo GA. Transmisión oral de *Trypanosoma cruzi*: un nuevo escenario epidemiológico de la enfermedad de Chagas en Colombia y otros países suramericanos. *Biomédica*. 2014;34(4):631–41.
53. Adelaida S. Chagas: 5 problemas y una serie de soluciones [Internet]. ISGlobal. 2016. Available from: <http://www.isglobal.org/enfermedad-de-chagas>
54. Requena-Méndez A, Aldasoro E, de Lazzari E, Sicuri E, Brown M, Moore DAJ, et al. Prevalence of Chagas Disease in Latin-American Migrants Living in Europe: A Systematic Review and Meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(2):1–15.
55. World Health Organization. Weekly epidemiological record (WER). Vol. 90, WHO. 2015.
56. Florez Sanchez AC, Caicedo Diaz RA. Informe de la vigilancia serológica de la Enfermedad de Chagas desde el Laboratorio Nacional de Referencia 2016. Bogotá D.C; 2016.
57. Sabino E, Badalà F, Nouri-mahdavi K, Raoof DA. Ten-year Incidence of Chagas Cardiomyopathy Among Asymptomatic *Trypanosoma cruzi*-Seropositive Former Blood Donors. *NIH Public Acces*. 2014;144(5):724–32.
58. Muñoz C, Solari A, APT W, Zulantay I. Caracterización de las Unidades Discretas de Tipificación de *Trypanosoma cruzi* según sus marcadores moleculares. *Ibero-Latinoamericana Parasitol*. 2013;72:5–21.
59. Voller A, Bartlett A, Bidwell DE. Enzyme immunoassays for parasitic diseases. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1976;70(2):98–106.
60. Da Silveira JF, Umezawa ES, Luquetti AO. Chagas disease: Recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. Vol. 17, *Trends in Parasitology*. 2001. 286-291 p.
61. Moncayo A, Luquetti AO. Multicentre double blind study for evaluation of *Trypanosoma cruzi* defined antigens as diagnostic reagents. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1990;85(4):489–95.
62. Umezawa ES, Luquetti AO, Levitus G, Ponce C, Ponce E, Henriquez D, et al. Serodiagnosis of Chronic and Acute Chagas' Disease with *Trypanosoma cruzi* Recombinant Proteins: Results of a Collaborative Study in Six Latin American Countries. *J Clin Microbiol*. 2004;42(1):449–52.
63. Gil J, Cimino R, Quiroga IL, Cajal S, Acosta N, Juarez M, et al. Reactividad del antígeno GST-SAPA de *trypanosoma cruzi* frente a sueros de pacientes con enfermedad de chagas y leishmaniasis. *Medicina (B Aires)*. 2011;71(2):113–9.
64. Bern C, Montgomery SP, Herwaldt BL, Rassi A, Marin-Neto JA, Dantas RO, et al. Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review. *Jama*. 2007;298(18):2171–81.
65. Viotti R, Vigliano C, Armenti H, Segura E. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: Clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *Am Heart J*. 1994;127(1):151–62.
66. Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A, Rosas F, et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2015;373(14):1295–306.



67. Pita Fernandez S, Pértegas Díaz S. Pruebas diagnósticas: Sensibilidad y especificidad. *Cad Aten Primaria*. 2010;10:120–4.
68. Otani MM, Hockley J, Guzmán Bracho C, Rijpkema S. Evaluation of two International Reference Standards for antibodies to *Trypanosoma cruzi* in a WHO collaborative study. WHO. 2011;(BS/2011.2181).
69. Hajian-Tilaki K. Sample size estimation in diagnostic test studies of biomedical informatics. *J Biomed Inform*. 2014 Apr;48:193–204.
70. Marcipar IS, Lagier CM. Advances in Serological Diagnosis of Chagas ' Disease by Using Recombinant Proteins. *Curr Top Trop Med*. 2011;
71. Longhi SA, Brandariz SB, Lafon SO, Niborski LL, Luquetti AO, Schijman AG, et al. Evaluation of in-house ELISA using *Trypanosoma cruzi* lysate and recombinant antigens for diagnosis of chagas disease and discrimination of its clinical forms. *Am J Trop Med Hyg*. 2012;87(2):267–71.
72. Caballero ZC, Sousa OE, Marques WP, Saez-Alquezar A, Umezawa ES. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;14(8):1045–9.
73. Flores-Chávez M, Cruz I, Rodríguez M, Nieto J, Franco E, Gárate T, et al. Comparación de técnicas serológicas convencionales y no convencionales para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas importada en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28(5):284–93.
74. World Health Organization. Report 1. Anti *Trypanosoma cruzi* assays: Operational Characteristics. OMS. 2009;
75. Remesar MC, Gamba C, Colaianni IF, Puppo M, Sartor P a, Murphy L, et al. Estimation of sensitivity and specificity of several *Trypanosoma cruzi* antibody assays in blood donors in Argentina. *NIH Public Acces*. 2010;49(11):2352–8.
76. Añez N, Romero M, Crisante G, Bianchi G, Parada H. Valoración comparativa de pruebas serodiagnósticas utilizadas para detectar enfermedad de Chagas en Venezuela. *Bol Malariol y Salud Ambient*. 2010;50(1):17–27.
77. Glender S. Evaluación de la sensibilidad y especificidad de reactivos para la determinación de anticuerpos para Chagas en los Bancos de Sangre. *Bioquímica y Patol Clínica*. 2015;79(2):30–8.
78. Alvarenga Americano do Brasil PE, Castro R, de Castro L. Commercial enzyme-linked immunosorbent assay versus polymerase chain reaction for the diagnosis of chronic Chagas disease: a systematic review and meta-analysis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016;111(1):1–19.
79. Umezawa ES, Bastos SF, Camargo ME, Yamauchi LM, Santos MR, Gonzalez A, et al. Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. *J Clin Microbiol*. 1999;37(5):1554–60.
80. De Pablos Torrós LM. Análisis global de la familia multigénica MASP (Mucin Associated Surface Proteins) de *Trypanosoma cruzi*. Universidad de Granada. Universidad de Granada; 2010.
81. Pirard M, Iihoshi N, Marleen B, Basanta P, Lopez F. Transfusion practice.



- Transfusion. 2000;40(September):1067–70.
82. Iborra-Bendicho MA, Albert-Hernández M, Márquez-Contreras C, Segovia-Hernández M. ARCHITECT Chagas ®: una nueva herramienta diagnóstica en la enfermedad de Chagas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30(8):463–5.
 83. Duarte LF, Flórez O, Rincón G, González CI. Comparison of seven diagnostic tests to detect *Trypanosoma cruzi* infection in patients in chronic phase of Chagas disease. Vol. 45, *Colombia médica* (Cali, Colombia). 2014. p. 61–6.
 84. Houghton RL, Benson DR, Reynolds LD, Mcneill PD, Sleath PR, Lodes MJ, et al. A Multi-Epitope Synthetic Peptide and Recombinant Protein for the Detection of Antibodies to *Trypanosoma cruzi* in Radioimmunoprecipitation-Confirmed and Consensus-Positive Sera. *J Infect Dis*. 1999;179:1226–34.
 85. Duthie MS, Guderian JA, Vallur AC, Misquith A, Liang H, Mohamath R, et al. Multi-epitope proteins for improved serological detection of *Trypanosoma cruzi* infection and Chagas Disease. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016;84(3):191–6.
 86. Hernández-Marín M, Almenares-Guash P, Martínez-Ortiz C, Gómez-Cordero I. Péptidos sintéticos del *Trypanosoma cruzi* para el inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Bioquímica*. 2003;28(1):2–7.
 87. Iborra Bendicho MA. Enfermedad de Chagas en Fase Crónica. Evaluación de diferentes métodos diagnósticos en una zona no endémica. Universidad de Murcia; 2013.

ANEXOS

Anexo 1. Definición y operacionalización de variables

Nombre de la variable	Tipo de variable	Nivel de medición	Definición	Unidad de medida
Año de toma de la muestra	Cualitativa	Ordinal	Año en que fue tomada la muestra	Año
Resultado de prueba de ELISA	Cualitativa	Dicotómica	Estado de infección por <i>T. cruzi</i> , evidenciado mediante detección de anticuerpos de tipo IgG por método enzimático	Positivo/Negativo
Resultado de prueba de IFI	Cualitativa	Ordinal	Estado de infección por <i>T. cruzi</i> , evidenciado mediante detección de anticuerpos de tipo IgG por método fluorescente	No reactivo, No reactivo 1/8, No reactivo 1/16, Reactivo 1/32, Reactivo 1/64, Reactivo 1/128, Reactivo 1/254, Reactivo 1/512, Reactivo 1/1024, Reactivo 1/2048
Resultado de prueba de PCR	Cualitativa	Dicotómica	Estado de infección por <i>T. cruzi</i> , evidenciado mediante detección directa de ADN parasitario.	Positivo/Negativo
Resultado de prueba de Inmunoblot	Cualitativa	Dicotómica	Estado de infección por <i>T. cruzi</i> , evidenciado mediante detección de anticuerpos de tipo IgG por método inmunocromatográfico	Positivo/Negativo
Resultado de prueba de examen directo	Cualitativa	Dicotómica	Estado de infección por <i>T. cruzi</i> , evidenciado mediante detección de formas parasitarias de forma directa.	Positivo/Negativo
Departamento de procedencia	Cualitativa	Nominal	División política de la República de Colombia, discriminada por fronteras geográficas.	Departamento
Edad	Cuantitativa	Razón	Años de vida que tiene el paciente	Años de vida cumplidos
Sexo	Cualitativa	Nominal	Condición orgánica de algunos seres vivos	Hombre/mujer
Estado clínico	Cualitativa	Nominal	Condición del paciente con relación a la presencia o no de síntomas clínicos estipulados según ficha clínico epidemiológica del LNR	Sintomático/asintomático

Fuente: Autores, elaboración propia con base a metodología del estudio

Anexo 2. Carta de aval institucional para el desarrollo de la investigación.



Bogotá D.C., 26 de Abril de 2016

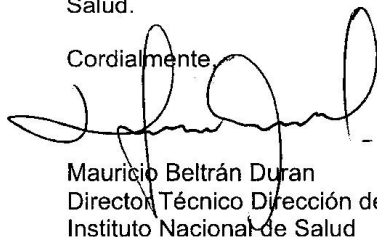
Señores
Universidad CES
Universidad del Rosario
Maestría en Epidemiología

Referencia: Aval para desarrollo de proyecto de investigación "Evaluación del Rendimiento Diagnóstico de Técnicas ELISA para el Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas en Colombia"

Por medio del presente la Dirección de Redes en Salud Pública del Instituto Nacional de Salud, concede a Ricardo Andrés Caicedo Díaz, identificado con cédula de ciudadanía 1.010.172.856 de Bogotá D.C, contratista del Laboratorio Nacional de Referencia de Parasitología del Instituto Nacional de Salud y estudiante de Maestría en Epidemiología de la Universidad CES y Universidad del Rosario, la aprobación y el aval para plantear, desarrollar, procesar y publicar los resultados de la investigación, "Evaluación del Rendimiento Diagnóstico de Técnicas ELISA para el Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas en Colombia". Destacando, además que los derechos morales pertenecen al grupo de investigación del cual hace parte el estudiante y que los derechos patrimoniales investigación hacen parte del Instituto Nacional de Salud.

El problema de investigación resuelve una necesidad técnica y operativa en el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas, evento de interés de Salud Pública en Colombia y permite en consonancia cumplir con el artículo 9, numeral 18, *"realizar la validación de reactivos, pruebas diagnósticas y de técnicas y procedimientos analíticos, acorde con sus competencias y según la normatividad vigente"*, del Decreto 2323 de 2006, el cual se enmarca en la misión del Instituto Nacional de Salud.

Cordialmente,



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

Av. Calle 26 No. 51-20, Bogotá, D.C., Colombia
Conmutador: (1) 220 77 Ext. 1703 - 1704 00
fax 220 7700 Ext. 1200 - 1291
e-mail: ins@ins.gov.co - Página web: www.ins.gov.co
línea gratuita nacional: 018000 113 400



Anexo 3. Convocatoria pública a casas comerciales para participación en proyecto



5000 - 21783

Bogotá, D.C., Noviembre 23 de 2015

CONVOCATORIA

PROVEEDORES ESTUCHES DE REACTIVOS TÉCNICAS DE ELISA

El Laboratorio de Parasitología de la Dirección de Redes en Salud Pública del INS en calidad de Laboratorio Nacional de Referencia y de acuerdo con el Decreto 2323 del 12 de Julio del 2006, capítulo II, artículo 9°, numeral 18 sobre *"Realizar la validación de reactivos, pruebas diagnósticas y técnicas y procedimientos analíticos, acorde con sus competencias y según la normativa vigente"* y acorde con lo definido en el comité Nacional de Chagas convoca a los diferentes fabricantes y proveedores de estuches de reactivos de Técnicas de Elisa para el diagnóstico serológico de Enfermedad de Chagas a participar de manera voluntaria en un ejercicio técnico de verificación de las características operativas de las pruebas que cada proveedor comercializa en el país bajo el registro sanitario otorgado por el Invima, el cual se realizará en el Laboratorio Nacional de Referencia de Parasitología de la Dirección de Redes en Salud Pública del Instituto Nacional de Salud (INS).

De acuerdo a esta norma, es posible entonces definir una estrategia a través de esta convocatoria que apunte a lograr los objetivos del Laboratorio Nacional de Referencia de Parasitología en función de la vigilancia serológica por laboratorio de la Enfermedad de Chagas por parte del INS y del Subprograma de Chagas por parte del Ministerio de Salud y Protección Social (MSPS) relacionados con las metas establecidas en el Plan Decenal de Salud Pública 2012-2021, en lo que se refiere a mejorar el acceso y calidad del diagnóstico.

Objetivo

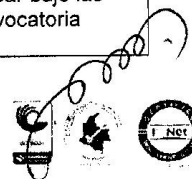
El objetivo es realizar una validación secundaria o verificación de los estuches de reactivos de las técnicas de Elisa que se comercializan actualmente en nuestro país bajo registro sanitario vigente otorgado por el Invima, los cuales están destinados para el inmunodiagnóstico de la Enfermedad de Chagas.

Estructura del proceso

El proceso de selección se realizará en dos fases:

FASE I	FASE II
Se realizará la validación de los estuches de reactivos de Técnicas de Elisa de mayor uso en Bancos de sangre y Laboratorios Departamentales de Salud Pública	Se realizará la validación de los demás estuches de reactivos de Técnicas de Elisa que deseen participar bajo las condiciones de la convocatoria

Av. Calle 26 No. 51-20, Bogotá, D.C., Colombia
Commutador: (1) 220 7700 Ext. 1703 - 1704
fax 220 7700 Ext. 1283 - 1269
e-mail: contactenos@ins.gov.co Página web: www.ins.gov.co
Línea gratuita nacional: 018000 113 400





**TODOS POR UN
NUEVO PAÍS**
PAZ EQUIDAD EDUCACION



Criterios de organización

El proceso se realizará teniendo en cuenta lo siguiente:

- Serán utilizados paneles de muestras procedentes de la seroteca de propiedad del LNR de Parasitología del INS, los cuales estarán caracterizados por un criterio de verdad o constructo conformado por tres componentes, un componente clínico, un componente serológico siguiendo el lineamiento de la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre uso de dos técnicas de principio diferente y en caso de discordancia una tercera técnica y un componente epidemiológico que hace referencia al nexo como tal.
- Se utilizarán además para la verificación controles o estándares biológicos de anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi*, estandarizados internacionalmente.
- Se realizará una verificación de las características operativas de las pruebas de ensayo establecidas por el fabricante para determinación de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi*.
- Se evaluarán de cada una de las pruebas, parámetros como sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, razones de verosimilitud (*Likelyhood ratio*) positiva y negativa, variabilidad de las razones de verosimilitud, exactitud o eficiencia y adicionalmente se determinaran parámetros como precisión en términos de Repetibilidad y Reproducibilidad, límites de cuantificación y límites de detección, con el fin de verificar su comportamiento analítico.
- Aquellos estuches de reactivos cuyas características operativas estén dentro de los parámetros de aceptación del proceso de verificación serán recomendados por parte del LNR del INS para ser utilizados como técnicas de diagnóstico serológico de la Enfermedad de Chagas en el marco del proceso de certificación del Plan de interrupción de la transmisión de *Trypanosoma cruzi* planteado como una de las metas en el Plan Decenal de Salud Pública de nuestro país y como técnicas de apoyo diagnóstico a la vigilancia rutinaria del evento tanto por parte del LNR como por parte de la Red Nacional de Bancos de Sangre.

Los proveedores o fabricantes interesados en participar en esta convocatoria deberán suministrar 6 estuches necesarios para el proceso de verificación, facilitar el equipo de ser necesario o autorizar su uso para esta verificación en caso de que este se encuentre en las instalaciones del INS, manifestar por escrito su intención de participar bajo las condiciones de esta convocatoria mediante una carta de intención, la cual deberá ser enviada en medio físico al Grupo de Parasitología del INS con la profesional referente del Programa de Chagas, Carolina Flórez Sánchez, adicionalmente escaneada y enviada al correo electrónico aflorez@ins.gov.co con copia a mbeltrand@ins.gov.co.

Av. Calle 26 No. 51-20, Bogotá, D.C., Colombia
Commutador: (1) 220 7700 Ext. 1703 - 1704
fax 220 7700 Ext. 1283 - 1269
e-mail: contactenos@ins.gov.co Página web: www.ins.gov.co
línea gratuita nacional: 018000 113 400





**TODOS POR UN
NUEVO PAÍS**
PAZ EQUIDAD EDUCACIÓN



Cronograma FASE I

- Divulgación de la convocatoria: **Noviembre 30 de 2015**
- Recepción de cartas de intención para participación: **Diciembre 01 al 15 de 2015**
- Confirmación de lista de participantes por parte del INS: **Diciembre 15 al 18 de 2015**
- Reunión preliminar para revisar las condiciones técnicas de equipos y disponibilidad de reactivos con cada proveedor. **Enero 12 al 15 de 2016**
- Entrega de los requisitos por parte de los proveedores al Laboratorio de Parasitología del INS. **Enero 18 al 29 de 2016**
- Divulgación de resultados para cada uno de los participantes: **Abril 11 a Abril 23 de 2016**

FASE II

La fase II de esta convocatoria se dará inicio a partir del mes de mayo de 2016, previamente se dará a conocer el cronograma.

Atentamente

MAURICIO BELTRAN DURAN
Director Técnico de Redes en Salud Pública
Instituto Nacional de Salud

Elaboró: Astrid Carolina Flórez Sánchez. Profesional especializada. Referente Programa de Chagas.
Laboratorio Nacional de Referencia



Anexo 4. Características operativas de las pruebas de ELISA

Tabla 16. Características operativas de las pruebas de ELISA

Técnicas evaluadas	Sensibilidad IC95%	Especificidad IC95%	Exactitud IC95%	VPP IC95%	VPN IC95%	LR+ IC95%	LR- IC95%
Chagas ELISA IgG	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	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 (0,00 - 0,03)
Chagatest ELISA rec v 4.0	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	98,44% (96,72 – 100)	97,96% (95,98 - 99,93)	98,20% (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	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	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	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)

IC95%: Intervalo de confianza al 95%;

VPP: Valor predictivo Positivo; VPN: Valor Predictivo Negativo;

LR+: Razón de Verosimilitud Positivo; LR-: Razón de Verosimilitud Negativo

Prevalencia del muestreo: 51,10%

Fuente: Autores, elaborado con base en los resultados de las características operativas.

Anexo 5. Estimaciones puntuales e intervalos de confianza de las características operativas de las combinaciones en serie y en paralelo.

Tabla 17. Características operativas de combinaciones en serie de ELISA para la detección de anticuerpos anti *T. cruzi*.

Primera Prueba	Segunda Prueba	Sensibilidad IC95%	Especificidad IC95%	Exactitud IC95%	VPP IC95%	VPN IC95%
BiosChile	Wiener	98,44 (96,72 - 100,00)	100,00 (99,80 - 100,00)	99,20 (98,32 - 100,00)	100,00 (99,80 - 100,00)	98,39 (96,63 - 100,00)
	Architect	98,05 (96,16 - 99,94)	100,00 (99,80 - 100,00)	99,00 (98,03 - 99,97)	100,00 (99,80 - 100,00)	98,00 (96,06 - 99,94)
	BioKit	97,66 (95,61 - 99,70)	100,00 (99,80 - 100,00)	98,80 (97,75 - 99,85)	100,00 (99,80 - 100,00)	97,61 (95,52 - 99,70)
	DiaPro	94,92 (92,04 - 97,81)	100,00 (99,80 - 100,00)	97,41 (95,91 - 98,90)	100,00 (99,79 - 100,00)	94,96 (92,10 - 97,82)
	Vircell	99,22 (97,94 - 100,00)	100,00 (99,80 - 100,00)	99,60 (98,95 - 100,00)	100,00 (99,80 - 100,00)	99,19 (97,87 - 100,00)
	Umelisa	92,19 (88,70 - 95,67)	99,59 (98,59 - 100,00)	95,81 (93,95 - 97,66)	99,58 (98,54 - 100,00)	92,42 (89,04 - 95,81)
Umelisa	Architect	92,58 (89,17 - 95,98)	100,00 (99,80 - 100,00)	96,21 (94,44 - 97,98)	100,00 (99,79 - 100,00)	92,80 (89,50 - 96,11)
	BioKit	91,80 (88,24 - 95,35)	100,00 (99,80 - 100,00)	95,81 (93,95 - 97,66)	100,00 (99,79 - 100,00)	92,11 (88,68 - 95,53)
	DiaPro	88,67 (84,59 - 92,75)	99,59 (98,59 - 100,00)	94,01 (91,83 - 96,19)	99,56 (98,48 - 100,00)	89,38 (85,54 - 93,22)
	Wiener	91,80 (88,24 - 95,35)	100,00 (99,80 - 100,00)	95,81 (93,95 - 97,66)	100,00 (99,79 - 100,00)	92,11 (88,68 - 95,53)
	BiosChile	92,19 (88,70 - 95,67)	99,59 (98,59 - 100,00)	95,81 (93,95 - 97,66)	99,58 (98,54 - 100,00)	92,42 (89,04 - 95,81)
	Vircell	92,58 (89,17 - 95,98)	100,00 (99,80 - 100,00)	96,21 (94,44 - 97,98)	100,00 (99,79 - 100,00)	92,80 (89,50 - 96,11)

IC95%: Intervalo de confianza al 95%;

VPP: Valor predictivo Positivo; VPN: Valor Predictivo Negativo;

Prevalencia del muestreo: 51,10%

Fuente: Autores, elaborado con base en los resultados de las características operativas.

Tabla 18. Características operativas de combinaciones en paralelo de ELISA para la detección de anticuerpos anti *T. cruzi*.

Pruebas realizadas en paralelo (se realizan simultáneamente)		Sensibilidad IC95%	Especificidad IC95%	Exactitud IC95%	VPP IC95%	VPN IC95%
BiosChile	Wiener	99,61 % (98,65 - 100,00)	95,92 % (93,24 - 98,60)	97,80 % (96,42 - 99,19)	96,23 % (93,74 - 98,71)	99,58 % (98,54 - 100,00)
	Architect	99,61 % (98,65 - 100,00)	95,92 % (93,24 - 98,60)	97,80 % (96,42 - 99,19)	96,23 % (93,74 - 98,71)	99,58 % (98,54 - 100,00)
	BioKit	99,61 % (98,65 - 100,00)	92,65 % (89,18 - 96,12)	96,21 % (94,44 - 97,98)	93,41 % (90,28 - 96,53)	99,56 % (98,48 - 100,00)
	DiaPro	100,00 % (99,80 - 100,00)	95,10 % (92,20 - 98,01)	97,60 % (96,17 - 99,04)	95,52 % (92,86 - 98,18)	100,00 % (99,79 - 100,00)
	Vircell	99,61 % (98,65 - 100,00)	95,51 % (92,71 - 98,31)	97,60 % (96,17 - 99,04)	95,86 % (93,28 - 98,45)	99,57 % (98,53 - 100,00)
	Umelisa	99,61 % (98,65 - 100,00)	95,92 % (93,24 - 98,60)	97,80 % (96,42 - 99,19)	96,23 % (93,74 - 98,71)	99,58 % (98,54 - 100,00)
Umelisa	Architect	98,44 % (96,72 - 100,00)	95,51 % (92,71 - 98,31)	97,01 % (95,41 - 98,60)	95,82 % (93,21 - 98,43)	98,32 % (96,48 - 100,00)
	BioKit	98,83 % (97,31 - 100,00)	92,24 % (88,69 - 95,80)	95,61 % (93,71 - 97,50)	93,01 % (89,80 - 96,23)	98,69 % (97,00 - 100,00)
	DiaPro	99,61 % (98,65 - 100,00)	95,10 % (92,20 - 98,01)	97,41 % (95,91 - 98,90)	95,51 % (92,83 - 98,18)	99,57 % (98,52 - 100,00)
	Wiener	99,61 % (98,65 - 100,00)	95,51 % (92,71 - 98,31)	97,60 % (96,17 - 99,04)	95,86 % (93,28 - 98,45)	99,57 % (98,53 - 100,00)
	Vircell	99,61 % (98,65 - 100,00)	95,10 % (92,20 - 98,01)	97,41 % (95,91 - 98,90)	95,51 % (92,83 - 98,18)	99,57 % (98,52 - 100,00)
Architect	BioKit	99,22 % (97,94 - 100,00)	92,65 % (89,18 - 96,12)	96,01 % (94,19 - 97,82)	93,38 % (90,24 - 96,52)	99,13 % (97,70 - 100,00)
	DiaPro	99,61 % (98,65 - 100,00)	95,92 % (93,24 - 98,60)	97,80 % (96,42 - 99,19)	96,23 % (93,74 - 98,71)	99,58 % (98,54 - 100,00)
	Wiener	99,61 % (98,65 - 100,00)	96,73 % (94,31 - 99,16)	98,20 % (96,94 - 99,47)	96,96 % (94,69 - 99,22)	99,58 % (98,55 - 100,00)
	Vircell	99,61 % (98,65 - 100,00)	95,92 % (93,24 - 98,60)	97,80 % (96,42 - 99,19)	96,23 % (93,74 - 98,71)	99,58 % (98,54 - 100,00)
BioKit	DiaPro	100,00 % (99,80 - 100,00)	91,84 % (88,20 - 95,47)	96,01 % (94,19 - 97,82)	92,75 % (89,51 - 95,99)	100,00 % (99,78 - 100,00)
	Wiener	99,61 % (98,65 - 100,00)	92,65 % (89,18 - 96,12)	96,21 % (94,44 - 97,98)	93,41 % (90,28 - 96,53)	99,56 % (98,48 - 100,00)
	Vircell	99,61 % (98,65 - 100,00)	92,24 % (88,69 - 95,80)	96,01 % (94,19 - 97,82)	93,07 % (89,88 - 96,26)	99,56 % (98,48 - 100,00)
DiaPro	Wiener	100,00 % (99,80 - 100,00)	95,92 % (93,24 - 98,60)	98,00 % (96,68 - 99,33)	96,24 % (93,77 - 98,71)	100,00 % (99,79 - 100,00)
	Vircell	100,00 % (99,80 - 100,00)	96,68 % (94,21 - 99,15)	98,39 % (97,18 - 99,60)	96,97 % (94,71 - 99,23)	100,00 % (99,79 - 100,00)
Vircell	Wiener	99,61 % (98,65 - 100,00)	95,92 % (93,24 - 98,60)	97,80 % (96,42 - 99,19)	96,23 % (93,74 - 98,71)	99,58 % (98,54 - 100,00)

IC95%: Intervalo de confianza al 95%; VPP: Valor predictivo Positivo; VPN: Valor Predictivo Negativo; Prevalencia del muestreo: 51,10%

Fuente: Autores, elaborado con base a los resultados de las características operativas.

Anexo 6. Predicciones del comportamiento de pruebas ELISA

Predicciones del desempeño de las pruebas de ELISA en serie

Las variables de la Tabla 19, se explican a continuación:

Primera Prueba

Variable	Descripción
Primera prueba	Nombre de la primera prueba utilizada como prueba de tamizaje.
Falsos positivos (1P)	Número de pacientes libres de la infección, pero con resultado positivo, por tanto, pasan a segunda prueba de ELISA
Falsos negativos (1P)	Número de pacientes con la infección, que no son detectados por la primera prueba
Pacientes a segunda	Número de pacientes con resultado positivo en la primera prueba
VPP 1 ^{ra} Prueba	Probabilidad de que el paciente este enfermo tras recibir el resultado positivo de la primera prueba
Total infectados captados	Número de personas infectadas captadas tras la aplicación de la primera prueba.

Segunda Prueba

Variable	Descripción
Segunda prueba	Nombre de la segunda prueba utilizada como prueba de confirmación
Falsos Positivos (2P)	Número de pacientes libres de la infección, pero con resultado positivo en ambas pruebas, por tanto, recibirán tratamiento sin necesitarlo.
Falsos negativos (2P)	Número de pacientes con la infección, que no son detectados tras la prueba de confirmación, sin embargo, sometidos a tercera prueba.
Pacientes sometidos a tercera prueba	Número de pacientes con resultados discrepantes entre las dos ELISA y sometidos a tercera prueba.

Tercera Prueba

Variable	Descripción
Falsos Positivos (3P)	Número de pacientes libres de la infección, pero clasificado como positivo, después de aplicar tres pruebas diagnósticas, por tanto, recibirán tratamiento sin necesitarlo.
Falsos negativos (3P)	Número de pacientes con la infección, que no son detectados tras aplicar tres pruebas serológicas, de tal forma no será tratado.
% de infectados captados	Porcentaje de verdaderos positivos que serán tratados tras la aplicación del algoritmo serológico.
VPP (3 ^{ra} Prueba)	Probabilidad que tiene el paciente de estar infectado, después de recibir dos de tres pruebas positivas.
VPN (3 ^{ra} Prueba)	Probabilidad que tiene el paciente de estar sano, después de recibir dos de tres pruebas negativas.



Tabla 19. Predicción del comportamiento de las pruebas de ELISA en serie
Hoja 1 de 4: Prevalencia 1%

Primera Prueba	Falsos Positivos	Falsos Negativos	Pacientes a segunda prueba	VPP	Total infectados captados	Segunda prueba	Falsos Positivos (con 2 pruebas)	Falsos Negativos (con 2 pruebas)	Pacientes sometidos a tercera (IFI)	Falsos Positivos (3P)	Falsos Negativos (3 P)	% de infectados captados	VPP (3P)	VPN (3P)
BiosChile	202	1	301	32,90%	99	Architect	4	2	200	8	1	99,00%	92,52	99,99
BiosChile	202	1	301	32,90%	99	Biokit	11	2	193	15	1	99,00%	86,84	99,99
BiosChile	202	1	301	32,90%	99	DiaPro	6	4	200	10	1	99,00%	90,82	99,99
BiosChile	202	1	301	32,90%	99	Umelisa	5	7	204	9	1	99,00%	91,67	99,99
BiosChile	202	1	301	32,90%	99	Vircell	5	0	197	9	1	99,00%	91,67	99,99
BiosChile	202	1	301	32,90%	99	Wiener	4	1	199	8	1	99,99%	91,67	99,99
Umelisa	243	7	336	27,70%	93	Architect	5	1	239	10	7	93,00%	90,29	99,92
Umelisa	243	7	336	27,70%	93	Biokit	13	2	232	18	7	93,00%	83,78	99,93
Umelisa	243	7	336	27,70%	93	DiaPro	7	4	240	12	7	93,00%	88,57	99,93
Umelisa	243	7	336	27,70%	93	Vircell	6	0	237	11	7	93,00%	89,42	99,93
Umelisa	243	7	336	27,70%	93	Wiener	5	1	239	10	7	93,00%	90,29	99,93
Umelisa	243	7	336	27,70%	93	BiosChile	5	1	239	10	7	93,00%	90,29	99,93
Vircell	243	0*	343	29,2%	100	Architect	5	2	240	10	0	99,9%	90,90	99,93
Vircell	243	0	343	29,2%	100	Biokit	13	2	232	18	0	99,9%	84,75	100,00
Vircell	243	0	343	29,2%	100	DiaPro	7	4	240	12	0	99,9%	89,29	100,00
Vircell	243	0	343	29,2%	100	Umelisa	6	7	240	11	0	99,9%	90,09	100,00
Vircell	243	0	343	29,2%	100	Wiener	5	1	239	10	0	99,9%	90,90	100,00
Vircell	243	0	343	29,2%	100	BiosChile	5	1	239	10	0	99,9%	90,90	100,00

Fuente: Autores, elaborado con base en los resultados de las características operativas.



Tabla 19. (continuación) Predicción del comportamiento de las pruebas ELISA en serie
Hoja 2 de 4: Prevalencia 10%

Primera Prueba	Falsos Positivos	Falsos Negativos	Pacientes a segunda prueba	VPP	Total infectados captados	Segunda prueba	Falsos Positivos (con 2 pruebas)	Falsos Negativos (con 2 pruebas)	Pacientes sometidos a tercera (IFI)	Falsos Positivos (3P)	Falsos Negativos (3 P)	% de infectados captados	VPP (3P)	VPN (3P)
BiosChile	184	8	1176	84,40%	992	Architect	4	15	195	8	8	99,20%	99,20	99,91
BiosChile	184	8	1176	84,40%	992	Biokit	10	19	193	13	8	99,20%	98,70	99,91
BiosChile	184	8	1176	84,40%	992	DiaPro	5	43	222	9	9	99,10%	99,10	99,90
BiosChile	184	8	1176	84,40%	992	Umelisa	5	74	253	9	9	99,10%	99,10	99,90
BiosChile	184	8	1176	84,40%	992	Vircell	5	4	183	9	8	99,20%	99,10	99,91
BiosChile	184	8	1176	84,40%	992	Wiener	4	12	192	8	8	99,20%	99,20	99,91
Umelisa	220	74	1146	80,80%	926	Architect	4	14	230	8	74	92,60%	99,14	99,18
Umelisa	220	74	1146	80,80%	926	Biokit	12	18	226	16	74	92,60%	98,30	99,18
Umelisa	220	74	1146	80,80%	926	DiaPro	6	40	254	10	75	92,50%	98,93	99,17
Umelisa	220	74	1146	80,80%	926	Vircell	5	4	219	9	74	92,60%	99,04	99,18
Umelisa	220	74	1146	80,80%	926	Wiener	4	11	227	8	74	92,60%	99,14	99,18
Umelisa	220	74	1146	80,80%	926	BiosChile	4	7	223	8	74	92,60%	99,14	99,18
Vircell	220	4	1216	81,91%	996	Architect	4	16	232	8	4	99,60%	99,20%	99,96%
Vircell	220	4	1216	81,91%	996	Biokit	12	19	227	16	4	99,60%	98,42%	99,96%
Vircell	220	4	1216	81,91%	996	DiaPro	6	43	257	10	5	99,50%	99,00%	99,94%
Vircell	220	4	1216	81,91%	996	Umelisa	4	74	290	10	5	99,50%	99,20%	99,94%
Vircell	220	4	1216	81,91%	996	Wiener	4	12	228	12	4	99,60%	99,20%	99,96%
Vircell	220	4	1216	81,91%	996	BiosChile	4	8	224	8	4	99,60%	99,20%	99,96%

Fuente: Autores, elaborado con base en los resultados de las características operativas.



Tabla 19. (continuación) Predicción del comportamiento de las pruebas ELISA en serie
Hoja 3 de 4: Prevalencia 20%

Primera Prueba	Falsos Positivos	Falsos Negativos	Pacientes a segunda prueba	VPP	Total infectados captados	Segunda prueba	Falsos Positivos (con 2 pruebas)	Falsos Negativos (con 2 pruebas)	Pacientes sometidos a tercera (IFI)	Falsos Positivos (3P)	Falsos Negativos (3 P)	% de infectados captados	VPP (3P)	VPN (3P)
BiosChile	163	16	2147	92,40%	1984	Architect	3	31	191	6	17	99,15%	99,70	99,79
BiosChile	163	16	2147	92,40%	1984	Biokit	9	39	193	12	17	99,15%	99,40	99,79
BiosChile	163	16	2147	92,40%	1984	DiaPro	5	85	243	8	18	99,10%	99,60	99,78
BiosChile	163	16	2147	92,40%	1984	Umelisa	4	147	306	7	19	99,05%	99,65	99,76
BiosChile	163	16	2147	92,40%	1984	Vircell	4	8	167	7	16	99,20%	99,65	99,80
BiosChile	163	16	2147	92,40%	1984	Wiener	3	23	183	6	16	99,20%	99,70	99,80
Umelisa	196	148	2048	90,40%	1852	Architect	4	29	221	8	149	92,55%	99,60	98,17
Umelisa	196	148	2048	90,40%	1852	Biokit	10	36	222	14	149	92,55%	99,25	98,17
Umelisa	196	148	2048	90,40%	1852	DiaPro	6	80	270	10	149	92,50%	99,46	98,17
Umelisa	196	148	2048	90,40%	1852	Vircell	5	7	198	9	148	92,60%	99,51	98,18
Umelisa	196	148	2048	90,40%	1852	Wiener	4	22	214	8	148	96,60%	99,57	98,18
Umelisa	196	148	2048	90,40%	1852	BiosChile	4	22	210	8	148	96,60%	99,57	98,18
Vircell	196	8	2188	91,04%	1992	Architect	4	31	223	8	9	99,55%	99,60%	99,89%
Vircell	196	8	2188	91,04%	1992	Biokit	10	39	225	14	9	99,55%	99,30%	99,89%
Vircell	196	8	2188	91,04%	1992	DiaPro	6	86	276	10	10	99,50%	99,50%	99,80%
Vircell	196	8	2188	91,04%	1992	Umelisa	5	148	339	9	11	99,45%	99,55%	99,86%
Vircell	196	8	2188	91,04%	1992	Wiener	4	25	217	8	8	99,60%	99,60%	99,90%
Vircell	196	8	2188	91,04%	1992	BiosChile	4	16	208	8	8	99,60%	99,60%	99,90%

Fuente: Autores, elaborado con base en los resultados de las características operativas.



Tabla 19. (continuación) Predicción del comportamiento de las pruebas ELISA en serie
Hoja 4 de 4: Prevalencia 40%

Primera Prueba	Falsos Positivos	Falsos Negativos	Pacientes a segunda prueba	VPP	Total infectados captados	Segunda prueba	Falsos Positivos (con 2 pruebas)	Falsos Negativos (con 2 pruebas)	Pacientes sometidos a tercera (IFI)	Falsos Positivos (3P)	Falsos Negativos (3 P)	% de infectados captados	VPP (3P)	VPN (3P)
BiosChile	122	31	4091	97,00%	3969	Architect	2	62	182	4	32	99,20%	99,90	99,47
BiosChile	122	31	4091	97,00%	3969	Biokit	6	77	193	8	33	99,18%	99,80	99,50
BiosChile	122	31	4091	97,00%	3969	DiaPro	3	171	290	5	34	99,15%	99,87	99,44
BiosChile	122	31	4091	97,00%	3969	Umelisa	3	294	413	5	36	99,10%	99,87	99,40
BiosChile	122	31	4091	97,00%	3969	Vircell	3	15	134	5	31	99,23%	99,87	99,49
BiosChile	122	31	4091	97,00%	3969	Wiener	2	46	166	4	32	99,20%	99,90	99,47
Umelisa	147	297	3850	96,18%	3703	Architect	3	58	202	6	298	92,55%	99,83	95,26
Umelisa	147	297	3850	96,18%	3703	Biokit	8	72	211	11	298	92,55%	99,70	95,26
Umelisa	147	297	3850	96,18%	3703	DiaPro	4	159	302	7	300	92,50%	99,81	95,29
Umelisa	147	297	3850	96,18%	3703	Vircell	4	14	157	7	297	92,58%	99,81	95,27
Umelisa	147	297	3850	96,18%	3703	Wiener	3	43	187	6	298	92,55%	99,83	95,26
Umelisa	147	297	3850	96,18%	3703	BiosChile	3	43	182 6	6	298	92,55%	99,83	95,26
Vircell	147	16	4131	96,44%	3984	Architect	3	62	206	6	17	99,56%	99,85%	99,72%
Vircell	147	16	4131	96,44%	3984	Biokit	8	78	217	11	17	99,58%	99,72%	99,72%
Vircell	147	16	4131	96,44%	3984	DiaPro	4	171	314	7	19	99,53%	99,82%	99,68%
Vircell	147	16	4131	96,44%	3984	Umelisa	4	296	439	7	21	99,48%	99,82%	99,65%
Vircell	147	16	4131	96,44%	3984	Wiener	3	47	191	6	17	99,58%	99,85%	99,72%
Vircell	147	16	4131	96,44%	3984	BiosChile	3	31	175	6	17	99,58%	99,85%	99,72%

Fuente: Autores, elaborado con base en los resultados de las características operativas.

Predicciones del desempeño de las pruebas de ELISA en paralelo

Las variables de la Tabla 20 se explican a continuación:

Variable	Descripción
Binomio de pruebas	Nombres de las pruebas del binomio, aplicadas simultáneamente
Positivos (2P)	Número de pacientes con resultados positivo en ambas pruebas
Negativos (2P)	Número de pacientes con resultado negativo en ambas pruebas
Falsos positivos (2P)	Número de pacientes no enfermos con resultado positivo en ambas pruebas, por tanto, serán llevados a tratamiento
Falsos negativos (2P)	Número de pacientes enfermos con resultados negativos en ambas pruebas, por tal, no se les administrara tratamiento
Discrepancias para tercera prueba (IFI)	Número de pacientes que tienen un resultado positivo en una ELISA y negativo en la otra ELISA.

Variable	Descripción
Falsos Positivos (3P)	Número de pacientes sin la infección caracterizados como positivos con dos de tres pruebas, por tanto, se les administrara tratamiento sin necesitarlo.
Falsos negativos (3P)	Número de pacientes con la infección, que no son detectados tras aplicar tres pruebas serológicas, de tal forma no serán tratado.
% de enfermos a tratar	Porcentaje de verdaderos positivos que serán tratados tras la aplicación del algoritmo serológico.
VPP (3P)	Probabilidad que tiene el paciente de estar infectado, después de recibir dos de tres pruebas positivas.
VPN (3P)	Probabilidad que tiene el paciente de estar sano, después de recibir dos de tres pruebas negativas.



Tabla 20. Predicción del comportamiento de las pruebas de ELISA en paralelo

Prevalencia	Población	Binomio de pruebas	Positivos (2P)	Negativos (2P)	Falsos positivos (2P)	Falsos negativos (2P)	Discrepancias para tercera prueba (IFI)	Falsos Positivos (3P)	Falsos Negativos (3P)	% de infectados captados	Valor predictivo Positivo (3P)	Valor predictivo Negativo (3P)
1%	10.000	BiosChile + Architect	102	9500	4	0	399	12	0	99,99%	89,29%	100,00%
1%	10.000	BiosChile + Vircell	104	9460	5	0	436	14	0	100,00%	87,72%	100,00%
1%	10.000	BiosChile + DiaPro	101	9421	6	0	478	15	0	100,00%	86,96%	100,00%
1%	10.000	BiosChile + Wiener	102	9500	4	0	398	12	0	100,00%	89,29%	100,00%
1%	10.000	BiosChile + Biokit	108	9183	11	0	709	25	0	100,00%	80,00%	100,00%
1%	10.000	BiosChile + Umelisa	97	9460	5	0	443	14	0	100,00%	87,72%	100,00%
10%	10.000	BiosChile + Architect	981	8636	4	0	383	11	0	100,00%	98,91%	100,00%
10%	10.000	BiosChile + Vircell	992	8600	4	0	408	12	0	100,00%	98,81%	100,00%
10%	10.000	BiosChile + DiaPro	955	8565	5	1	480	14	2	99,80%	98,62%	99,98%
10%	10.000	BiosChile + Wiener	985	8637	4	1	378	11	1	99,90%	98,91%	99,99%
10%	10.000	BiosChile + Biokit	983	8348	10	0	669	23	0	100,00%	97,75%	100,00%
10%	10.000	BiosChile + Umelisa	923	8601	4	1	476	12	1	99,80%	98,81%	99,98%
20%	10.000	BiosChile + Architect	1953	7677	3	0	366	9	1	99,95%	99,55%	99,99%
20%	10.000	BiosChile + Vircell	1981	7646	4	1	373	11	1	99,95%	99,45%	99,99%
20%	10.000	BiosChile + DiaPro	1904	7614	5	1	482	13	3	99,85%	99,35%	99,96%
20%	10.000	BiosChile + Wiener	1964	7677	3	0	359	9	1	99,95%	99,55%	99,99%
20%	10.000	BiosChile + Biokit	1955	7421	9	0	623	20	2	99,90%	99,01%	99,97%
20%	10.000	BiosChile + Umelisa	1841	7646	4	1	513	11	4	99,80%	99,45%	99,95%
40%	10.000	BiosChile + Architect	3909	5758	2	0	333	7	2	99,95%	99,83%	99,97%
40%	10.000	BiosChile + Vircell	3956	5734	3	0	310	8	1	99,98%	99,80%	99,98%
40%	10.000	BiosChile + DiaPro	3802	5711	4	1	487	10	5	99,88%	99,75%	99,92%
40%	10.000	BiosChile + Wiener	3924	5758	2	0	318	7	1	99,98%	99,83%	99,98%
40%	10.000	BiosChile + Biokit	3899	5567	7	1	534	16	3	99,93%	99,60%	99,95%
40%	10.000	BiosChile + Umelisa	3677	5736	3	2	587	8	8	99,80%	99,80%	99,87%

Fuente: Autores, elaborado con base en los resultados de las características operativas.

Anexo 7. Recomendación técnica sobre el uso de técnicas ELISA.



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

Av. Calle 26 No. 51-20, Bogotá, D.C., Colombia
Conmutador: (1) 220 77 Ext. 1703 - 1704 00
fax 220 7700 Ext.1200 – 1291
e-mail: ins@ins.gov.co - Página web: www.ins.gov.co
línea gratuita nacional: 018000 113 400

2





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.

Av. Calle 26 No. 51-20, Bogotá, D.C., Colombia
Conmutador: (1) 220 77 Ext. 1703 - 1704 00
fax 220 7700 Ext. 1200 - 1291
e-mail: ins@ins.gov.co - Página web: www.ins.gov.co
Línea gratuita nacional: 018000 113 400