



# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

## Comparación de técnicas serológicas convencionales y no convencionales para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas importada en España

María Flores-Chávez<sup>a</sup>, Israel Cruz<sup>a</sup>, Mercedes Rodríguez<sup>a</sup>, Javier Nieto<sup>a</sup>, Elena Franco<sup>b</sup>, Teresa Gárate<sup>a</sup> y Carmen Cañavate<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España

<sup>b</sup> Centro de Transfusión Sanguínea de Sevilla-Huelva y Banco de Tejidos, Sevilla, España

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 2 de abril de 2009

Aceptado el 17 de julio de 2009

On-line el 5 de diciembre de 2009

#### Palabras clave:

Enfermedad de Chagas importada

*Trypanosoma cruzi*

Serología

Sensibilidad

Especificidad

Reactividad cruzada

### RESUMEN

**Introducción:** En España, la infección por *Trypanosoma cruzi* constituye una importante parasitosis importada debido al incremento de población procedente de área endémica. Como el diagnóstico de laboratorio de la fase crónica de la enfermedad se basa en la detección de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi*, nuestros objetivos fueron los siguientes: i) comparar 10 técnicas de determinación de anticuerpos anti-*T. cruzi*; ii) evaluar su reactividad cruzada frente a enfermedades relacionadas, y iii) valorar el enzoinmunoanálisis (ELISA)-rk39 y la inmunofluorescencia indirecta (IFI)-*Leishmania* para el diagnóstico diferencial de la leishmaniasis por *Leishmania infantum*.

**Material y Métodos:** Se analizaron 223 sueros: 40 caracterizados por la empresa Qpanel y 183 procedentes de la seroteca del Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología (chagásicos=66, sanos=97, leishmaniasis visceral=30 y malaria=30). La pruebas utilizadas fueron IFI y ELISA *in house*, 5 ELISA comerciales (Certest/Abbot Laboratories, BiosChile; Ortho<sup>®</sup> Clinical Diagnostics; BLK Diagnostic; bioMérieux, y Biokit), la prueba de aglutinación en gel y 2 pruebas inmunocromatográficas (Operon y CTK Biotech). Los últimos 4 ensayos utilizaban antígenos recombinantes (pruebas no convencionales).

**Resultados:** La IFI y los ensayos de ELISA presentaron una sensibilidad entre el 97 y el 100%. Las pruebas inmunocromatográficas presentaron menor sensibilidad (92–96%). Todas las pruebas no convencionales presentaron menor número de reacciones cruzadas. El ELISA-rk39-*Leishmania* no presentó reactividad cruzada con los sueros chagásicos.

**Conclusiones:** En general, nuestros resultados confirman los datos obtenidos por otros autores. La sensibilidad de los ELISA es superior con respecto al resto de las pruebas, por lo que estas técnicas serían las más adecuadas para realizar el cribado serológico de la infección por *T. cruzi*. Una aproximación adecuada es la combinación de una prueba que utilice antígeno total con otra basada en antígenos recombinantes o péptidos sintéticos.

© 2009 Elsevier España, S.L.. Todos los derechos reservados.

## Comparison of conventional and non-conventional serological tests for the diagnosis of imported Chagas disease in Spain

### ABSTRACT

**Introduction:** *Trypanosoma cruzi* infection is a major imported parasitic disease in Spain, because of the increase of immigrants from endemic areas. Since the laboratory diagnosis during the chronic phase is based on detection of anti-*T. cruzi* IgG antibodies, our aims were to compare 10 tests for determining anti-*T. cruzi* antibodies, to assess their cross-reactivity with related diseases, and to evaluate the rk39-ELISA and IFAT-*Leishmania* tests as tools for the differential diagnosis of leishmaniasis due to *Leishmania infantum*.

**Material and Methods:** A total of 223 sera were tested: 40 had been previously characterized by Qpanel, and 183 were obtained from the serum library of the Parasitology Department, Centro Nacional de Microbiología (66 chagasic, 97 healthy, 30 visceral leishmaniasis, and 30 malaria). Samples were examined using in-house IFAT and ELISA, 5 commercial ELISAs (Certest/Abbot Laboratories/BiosChile; Ortho<sup>®</sup> Clinical Diagnostics; BLK Diagnostic; bioMérieux; and Biokit), particle gel agglutination (ID-PaGIA), and two immunochromatographic assays (Operon and CTK Biotech). The last 4 tests are based in recombinant antigens (non-conventional tests).

**Results:** The IFAT and ELISAs showed a sensitivity of 97% to 100%. The immunochromatographic tests had somewhat lower sensitivity (92–96%). All non-conventional tests presented a smaller number of cross-reactions. *Leishmania*-Rk39-ELISA did not show cross-reactivity with chagasic sera.

#### Keywords:

Imported Chagas disease

*Trypanosoma cruzi*

Serology

Sensitivity

Specificity

Cross-reactivity

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: ccanave@isciii.es (C. Cañavate).

**Conclusions:** In general, our results confirm the data obtained by other authors. The sensitivity of ELISA is higher than other tests; therefore, these techniques would be the most appropriate for screening of *T. cruzi* infection. A suitable approach is the combination of a test using total antigen with another based on either recombinant antigens or synthetic peptides.

© 2009 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

## Introducción

La enfermedad de Chagas es uno de los principales problemas de salud que afecta a la población latinoamericana. Sin embargo, los actuales cambios demográficos están ampliando los límites geográficos de su distribución.

En la década de 1980 la Organización Mundial de la Salud estimaba que entre 16 y 18 millones de personas se encontraban infectadas por *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de esta enfermedad<sup>1</sup>. En el año 2006 la Organización Panamericana de la Salud (OPS) publicó una nueva estimación, según la que el número de individuos afectados estaría alrededor de 7,6 millones<sup>2</sup>.

El *T. cruzi* se transmite por contacto con las heces contaminadas de los insectos vectores (triatóminos), por transfusión sanguínea, de forma congénita, por transplantes de órganos y últimamente se está describiendo un mayor número de casos por transmisión oral<sup>3</sup>. Tras un corto período de tiempo conocido como fase aguda, los individuos que no reciben tratamiento específico evolucionan a la fase crónica de la infección. En esta fase, del 50 al 70% de las personas infectadas no desarrollará sintomatología alguna, y pueden permanecer en este estado durante el resto de sus vidas (forma indeterminada de la infección). Sin embargo, transcurridos 20–30 años o más, el 30–50% de los individuos presentará alteraciones cardíacas, digestivas y, en menor medida, del sistema nervioso<sup>1</sup>. Sólo del 1 al 2% de los casos se detecta en la fase aguda, pues la mayoría se diagnostica en la fase crónica.

Actualmente no existe una técnica de referencia para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. En la fase aguda, los métodos parasitológicos son los más idóneos; mientras que en la fase crónica, la parasitemia suele ser baja y en ocasiones indetectable, por lo que el diagnóstico se realiza mediante la detección de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi*. Existen 2 grupos de pruebas para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi*: 1) las pruebas convencionales, en las que el antígeno puede ser el parásito completo o extractos solubles o purificados cuya composición es una mezcla compleja de antígenos, y 2) las pruebas no convencionales que utilizan antígenos recombinantes o péptidos sintéticos<sup>1</sup>.

En España la enfermedad de Chagas es una parasitosis emergente e importada, debido al incremento en la migración de población procedente de zonas endémicas. Según el Instituto

Nacional de Estadística, los inmigrantes latinoamericanos representan el 34% del total de la población extranjera<sup>4</sup> (1,8 millones) y desde el año 2005 los centros de transfusión sanguínea están obligados a realizar una prueba validada para descartar la infección por *T. cruzi* en individuos con riesgo epidemiológico (Real Decreto 1088/2005)<sup>5</sup>. Según estudios preliminares en centros de transfusión sanguínea, la seroprevalencia de la infección por *T. cruzi* en donantes de sangre con antecedentes de riesgo está alrededor del 1%<sup>6</sup>. En España, hasta la fecha, se han descrito 2 casos fatales de Chagas transfusional<sup>7,8</sup> y 4 casos de evolución favorable. Asimismo, la seroprevalencia en mujeres embarazadas latinoamericanas fluctúa entre el 1 y el 4,8%<sup>9–11</sup>, con una tasa de transmisión del 7,3%<sup>10</sup>.

Antes del año 2005 en el mercado español existía un número limitado de pruebas para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi*. Actualmente, el número de kits comerciales es cada vez mayor. Sin embargo, no se conoce la eficacia de éstos en el contexto epidemiológico español, donde la leishmaniasis causada por el tripanosomátido *Leishmania infantum* es una enfermedad endémica, y donde la elección de viajes a zonas tropicales incrementa el riesgo de exposición a otras parasitosis, como la malaria (MAL)<sup>12</sup>. Ambas protozoosis pueden ocasionar reactividad cruzada.

Por esto, los objetivos de este trabajo fueron los siguientes: i) comparar, mediante la utilización de sueros previamente caracterizados, los índices diagnósticos de una inmunofluorescencia indirecta (IFI) *in house*, un enzimoimmunoanálisis (ELISA) *in house* y 8 pruebas comerciales (5 ELISA, una prueba de aglutinación de partículas en gel con dos y tres antígenos recombinantes, y 2 inmunocromatografías) (tabla 1); ii) evaluar la reactividad cruzada con sueros de pacientes con evidencia serológica de leishmaniasis visceral (LEISH) y MAL, y iii) valorar la utilidad del antígeno recombinante rk39 e IFI-*Leishmania*, para discriminar la reactividad cruzada causada por *L. infantum*.

## Material y métodos

### Muestras de suero

Se emplearon 3 paneles de sueros.

**Tabla 1**  
Pruebas para la determinación de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi*

Grupo de prueba	Prueba	Nombre abreviado de la prueba
Convencional	Inmunofluorescencia indirecta <i>in house</i> (CNM)	IFI-CNM
	Inmunoensayo <i>in house</i> (CNM)	ELISA-CNM
	CERTEST Chagas ELISA test (BiosChile, Abbott Laboratories, Zaragoza, España)	Certest
	ORTHO <sup>®</sup> <i>Trypanosoma cruzi</i> ELISA Test System (Johnson and Johnson, High Wycombe, Reino Unido)	Ortho
	<i>T. cruzi</i> (Chagas' disease) IgG ELISA (BLK Diagnostics, Barcelona, España)	BLK
	ELISA cruzi (Enfermedad de Chagas), (bioMérieux <sup>®</sup> , Mercy-l'Etoile, Francia)	BioMérieux
No Convencional	Bioelisa Chagas (Biokit, Lliçà d' Amunt, España)	Biokit
	ID-PaGIA antibody test (DiaMed, Cressier sur Morat, Suiza)	
	Versión con 2 antígenos recombinantes	ID-PaGIA2
	Versión con 3 antígenos recombinantes	ID-PaGIA3
	Simple Stick Chagas (Operon S. A., Zaragoza, España)	ICT Operon
	OnSite Chagas Ab Combo-Cassette (CTK, Biotech, Inc., San Diego, California, EE. UU.)	ICT CTK

CNM: Centro Nacional de Microbiología; ELISA: enzimoimmunoanálisis; ICT: prueba inmunocromatográfica (*immunochromatographic test*); ID-PaGIA2: prueba de aglutinación en gel, versión con 2 péptidos; ID-PaGIA3: prueba de aglutinación en gel, versión con 3 péptidos; IFI: inmunofluorescencia indirecta.

Primer panel: elaborado por la empresa QPanel ([www.qpanel.com.br](http://www.qpanel.com.br)) y proporcionado por la OPS. Este panel constaba de 40 muestras de suero, 38 sueros reactivos (chagásicos diagnosticados en zona endémica) y 2 controles no reactivos.

Segundo panel: estaba constituido por 123 sueros, 28 sueros de pacientes latinoamericanos chagásicos crónicos diagnosticados en España, de los cuales 10 correspondían a individuos con parasitemia indetectable por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (seropositivos PCR negativos) y 18 con parasitemia detectable mediante PCR (seropositivos PCR positivos); 73 sueros de individuos sanos procedentes de Sudamérica y 22 sueros de individuos sanos españoles. Estas muestras se seleccionaron y se consideraron los resultados concordantes entre IFI-Centro Nacional de Microbiología (CNM) y ELISA-CNM *in house* y la información clínico-epidemiológica.

Tercer panel: incluyó 60 sueros de individuos con evidencia serológica o parasitológica de LEISH (n=30) o MAL (n=30), con títulos de anticuerpos anti-*Leishmania* entre 1/80 y 1/1.280 (IFI-*Leishmania in house*<sup>13</sup>), o anti-*Plasmodium* entre 1/1.280 y 1/5.120 (Falciparum-Spot IFI<sup>TM</sup>, bioMérieux<sup>®</sup>, Mercy-l'Etoile, Francia). Estos sueros procedían de casos activos y pasados de leishmaniasis (pacientes españoles) y MAL (pacientes africanos). Ninguno de los pacientes tenía antecedentes de viajes a Latinoamérica.

Los 2 últimos paneles se prepararon con muestras de la seroteca del Servicio de Parasitología, CNM, Instituto de Salud Carlos III. Todos los sueros estuvieron conservados a -20 °C hasta su uso.

#### Pruebas serológicas para la detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi*

IFI *in house* (IFI-CNM): se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Camargo (1966)<sup>14</sup>, con algunas modificaciones. El antígeno se preparó a partir de la mezcla proporcional de epimastigotes de cultivo en fase estacionaria de 2 cepas de *T.*

*cruzi* II (Mc y T) y una de *T. cruzi* I (Dm28). En cada pocillo se depositaron 10 µl de una suspensión de  $5 \times 10^6$  parásitos/ml. Como conjugado se utilizó anti-IgG humana marcada con fluoresceína (bioMérieux<sup>®</sup>). El umbral de positividad se estableció en la dilución 1/40. La reactividad a la dilución 1/20 y la observación de campos con parásitos fluorescentes y no fluorescentes a la dilución 1/40 se consideraron como resultados dudosos.

ELISA *in house* (ELISA-CNM): el antígeno fue un extracto soluble preparado a partir de cultivos de epimastigotes en fase estacionaria de las mismas cepas de *T. cruzi* empleadas en IFI, según el procedimiento descrito por Scott et al (1987)<sup>15</sup>, con algunas modificaciones. En resumen, por cada gramo de sedimento de parásitos se añadieron 8 ml de solución de lisis (20 mM Tris-clorídrico [Tris-HCl], 10 mM etilendiamino tetraacético [EDTA] pH 8) e inhibidores de proteasas (1 mM EDTA, 1 mM etilenglicol tetraacético [EGTA], 1 mM N-etilmaleinimida [NEM], 1 µM Pepstatin, 1 mM fluoruro de fenil metil sulfónico [PMSF], 100 µM N-tosil-L-fenil alanil clorometil cetona [TCPK]). Esta mezcla se sometió a descompresión de nitrógeno en una bomba de cavitación para favorecer la rotura de los parásitos (120–140 libra por pulgada cuadrada [PSI, pounds per square inch], 30 min). El extracto soluble se obtuvo tras centrifugación diferencial, primero a  $27.000 \times g$  durante 20 min, y luego a  $100.000 \times g$  durante 4 h. El sobrenadante se dializó en tampón fosfato salino (PBS) pH 7,4 y se conservó a -70 °C hasta su uso. La concentración de proteínas se determinó mediante el método del ácido bicinónico (BCA, Pierce, Rockford, Illinois, EE. UU.), según las instrucciones del fabricante.

Para realizar la prueba ELISA-CNM se sensibilizaron placas Nunc<sup>®</sup> Maxisorp con 1,5 µg/pocillo del antígeno soluble de *T. cruzi* diluido en tampón carbonato de 0,05 M pH 9,6 (0,5 µg de cada cepa de *T. cruzi* T, Mc y Dm28). Tras bloquear con PBS suplementado con albúmina sérica bovina al 3% y Tween-20 al 0,1%, la placa se lavó 5 veces con PBS Tween-20 al 0,1%. Se añadieron los sueros problema y controles diluidos al 1/100 en

**Tabla 2**  
Características e interpretación de las lecturas de las pruebas de detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi*

Prueba	Antígeno	Conjugado	Tiempo (min)	CO	Positivo	Negativo	Dudoso
IFI-CNM	Epimastigotes (T, Mc, Dm28)	Anti-IgG humana (FITC)	90	1/40	$\geq 1/40$	$< 1/20$	1/20
ELISA-CNM	Extracto soluble (T, Mc, Dm28)	Anti-IgG humana (Biot, Strep-HRP)	240	mCN+4DS	$DO \geq CO$	$DO < [0,8 \times CO]$	$DO \geq 0,8CO$ a $< CO$
Certest	Extracto total (Tulahuen, Mn)	Anti-IgG humana (HRP)	120	$[mCP+mCN] \times 0,35$	$DO > [1,1 \times CO]$	$DO < [0,9 \times CO]$	$DO=CO \pm 10\% CO$
Ortho	Extracto total	Anti-IgG humana (HRP)	180	$mCP \times 0,460$	$DO/CO \geq 1$	$DO/CO < 1$	No existe esta opción
BLK	Extracto total	Anti-IgG humana (HRP)	40	0,200	$DO > 0,220$	$DO < 0,180$	$DO \geq 0,180$ a $< 0,220$
bioMérieux	Extracto total	Anti-IgG humana (HRP)	90	mCN+0,250	$DO/CO \geq 1$	$DO/CO < 0,8$	$DO/CO \geq 0,8$ a $< 1$
Biokit	TcD, TcE, Pep2, TcLo1.2	Anti-IgG humana, anti-IgM humana (HRP)	90	mCN+0,300	$DO/CO \geq 1$	$DO/CO < 0,9$	$DO/CO \geq 0,9$ a $< 1$
ID-PaGIA2	Ag2, TcE	Anti-Ig humana	30	No establecido	Aglutinación en la parte superior o en el interior del gel	Sedimento compacto en la parte inferior del gel	Seudo aglutinación en la parte superior del gel y sedimento compacto en la parte inferior
ID-PaGIA3	Ag2, TcE, TcD						
ICT Operon	TcD, TcE, Pep2, SAPA		30	No establecido	Dos bandas	Banda control	No existe esta opción
ICT CTK	Antígenos recombinantes	Anti-IgG humana (oro coloidal)	30	No establecido	Dos bandas	Banda control	No existe esta opción

Biot: anti-IgG humana marcada con biotina; CN: control negativo; CNM: Centro Nacional de Microbiología; CO: *cut-off* 'umbral de reactividad' CP: control positivo; DO: densidad óptica; DS: desviación estándar; FITC: Isotiocianato de fluoresceína (*fluorescein isothiocyanate*); HRP: peroxidasa de rábano (*horseradish peroxidase*); ICT: prueba inmunocromatográfica (*immunochromatographic test*); ID-PaGIA2: prueba de aglutinación en gel, versión con 2 péptidos; ID-PaGIA3: prueba de aglutinación en gel, versión con 3 péptidos; IFI: inmunofluorescencia indirecta; m: media aritmética; Strep-HRP: estreptavidina marcada con peroxidada.

PBS Tween-20 con albúmina sérica bovina al 0,1%. Para revelar los complejos antígeno-anticuerpo se utilizó el sistema Biotina-Streptavidina (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, Alabama, EE. UU.). Como sustrato se empleó 2.2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (Sigma, St. Louis, Missouri, EE. UU.), diluido en tampón fosfato-citrato de 0,05 M pH 5 con el 0,03% de perborato de sodio (Sigma). La reacción se frenó con solución de Dodecil sulfato sódico (SDS, *sodium dodecyl sulfate*) al 5% (Sigma). Las absorbancias se midieron en un lector de ELISA (Mios Microplate Reader, DYNATECH, Tarpon Springs, Florida, EE. UU.) a 405 nm de longitud de onda. La línea de corte se definió como el promedio de los controles negativos más 4 desviaciones estándares (*cut-off* [CO, 'umbral de reactividad']).

**Pruebas comerciales:** todos los ensayos se realizaron de acuerdo a las instrucciones establecidas por los fabricantes de cada *kit*. La reactividad de cada una de las muestras se determinó según las especificaciones técnicas de cada ensayo. En la [tabla 2](#) se describen las características de las pruebas utilizadas en este trabajo. La comparación de la reactividad entre los diferentes

ensayos de ELISA se realizó mediante el cálculo del índice densidad óptica/CO.

#### Pruebas serológicas para la detección de anticuerpos anti-*Leishmania*

**ELISA-rk39 e IFI-*Leishmania*:** para determinar la presencia de anticuerpos anti-*Leishmania* mediante el antígeno rk39 se siguió el protocolo descrito por Burns et al<sup>16</sup>. La IFI-*Leishmania* se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Deniau et al<sup>13</sup>. En este último caso, el antígeno se preparó a partir de cultivos de promastigotes de la cepa de *L. infantum* MHOM/FR/78/LEM-75 (zimodema MON-1). El umbral de positividad se estableció en la dilución 1/80.

#### Análisis de datos

Con el apoyo del programa SPSS 15, se construyeron tablas de contingencia 2 × 2. Se calcularon los índices diagnósticos de sensibilidad y especificidad mediante el programa EPIDAT 3.1, se

**Tabla 3**

Reactividad de los sueros en las diferentes pruebas de detección de anticuerpos anti- *Trypanosoma cruzi*

Panel	Características de los sueros	N.º de sueros	N.º de muestras con resultados positivos										
			IFI-CNM	ELISA-CNM	Certest	Ortho	BLK	bio Mérieux	Biokit	ID-PaGIA2	ID-PaGIA3	ICT Operon	ICT CTK
1	Chagásico	38	37	38	38	38	37	38	38	33	37	33	37
	No Chagásico	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	Chagásico diagnosticado en España	28	28	28	28	28	4/4 <sup>a</sup>	27	28	28	28	28	26
	Sano												
	España	22	0	0	0	0	NR	0	0	0	0	0	1
	Bolivia	19	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	Brasil	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (3D)	0	1
	Argentina	14	0	0	0	0	0	0	0	0 (1D)	1 (2D)	1	1
	Ecuador	20	0	0	0	0	0	0	0	1 (1D)	1 (3D)	1	0
3	Leishmaniasis <sup>b</sup>	30	23 (77)	18 (60)	25 (83)	18 (60)	10 (33)	9 (30)	3 (10)	7D (0)	1+4D (3)	1 (3)	5 (17)
	Malaria <sup>b</sup>	30	0	0	0	0	3 (10)	0	4 (13)	1+2D (3)	1+4D (3)	9 (30)	3 (10)

CNM: Centro Nacional de Microbiología; D: dudoso; ELISA: enzimoimmunoanálisis; ICT: prueba inmunocromatográfica (*immunochromatographic test*); ID-PaGIA2: prueba de aglutinación en gel, versión con 2 péptidos; ID-PaGIA3: prueba de aglutinación en gel, versión con 3 péptidos; IFI: inmunofluorescencia indirecta; NR: no realizado.

<sup>a</sup> Evaluación con 4 sueros de esta población.

<sup>b</sup> Porcentaje de reactividad cruzada entre paréntesis.

**Tabla 4**

Comparación de las muestras con resultados discrepantes

Código	EC	IFI-CNM	ELISA-CNM	DO/CO								
				Certest	Ortho	BLK	bioMérieux	Biokit	ID-PaGIA2	ID-PaGIA3	ICT Operon	ICT CTK
PETC 07	Ch	1/40	1,92	2,08	3,24	0,43	2,05	1,17	N	P	P	P
PETC 10	Ch	1/80	3,90	1,70	3,29	5,38	4,42	3,51	N	P	N	P
PETC 11	Ch	1/ 20	1,78	1,70	2,56	1,60	2,84	1,71	N	N	N	N
PETC 13	Ch	1/80	3,99	1,96	2,82	5,18	2,72	3,45	P	P	N	P
PETC 15	Ch	1/80	3,96	2,17	3,32	5,07	2,90	2,22	N	P	P	P
PETC 25	Ch	1/160	4,56	2,68	3,65	8,08	4,03	2,95	P	P	N	P
PETC 35	Ch	1/160	4,54	2,53	3,36	8,25	5,21	4,42	N	P	N	P
ChSN 01	Ch	1/40	1,18	1,8	2,7	1,3	0,68	6,1	P	P	P	N
ChSN 02	Ch	1/160	2,84	1,5	2,6	2,8	1,89	1,6	P	P	P	N
Bol 111	H	N	0,04	0,45	0,16	0,25	0,09	1,56	N	N	N	N
Ecu 087	H	N	0,06	0,60	0,21	0,03	0,01	0,47	P	P	N	N
Arg 042	H	N	0,04	0,06	0,11	0,09	0,19	0,15	D	P	N	P
Arg 045	H	N	0,06	0,49	0,19	0,16	0,16	0,18	N	N	P	N
Ecu 091	H	N	0,08	0,46	0,05	0,07	0,32	0,38	N	N	P	N
Spa 120	H	N	0,04	0,39	0,02	nr	0,11	0,32	N	N	N	P
Bra 065	H	N	0,18	0,40	0,06	0,02	0,16	0,13	N	N	N	P

CNM: Centro Nacional de Microbiología; CO: *cut-off* 'umbral de reactividad'; Ch: individuo infectado por *Trypanosoma cruzi*; D: dudoso; DO: densidad óptica; EC: clasificación del estatus clínico; ELISA: enzimoimmunoanálisis; H: individuo control sano; ICT: prueba inmunocromatográfica (*immunochromatographic test*); ID-PaGIA2: prueba de aglutinación en gel, versión con 2 péptidos; ID-PaGIA3: prueba de aglutinación en gel, versión con 3 péptidos; IFI: inmunofluorescencia indirecta; N: negativo; P: positivo.

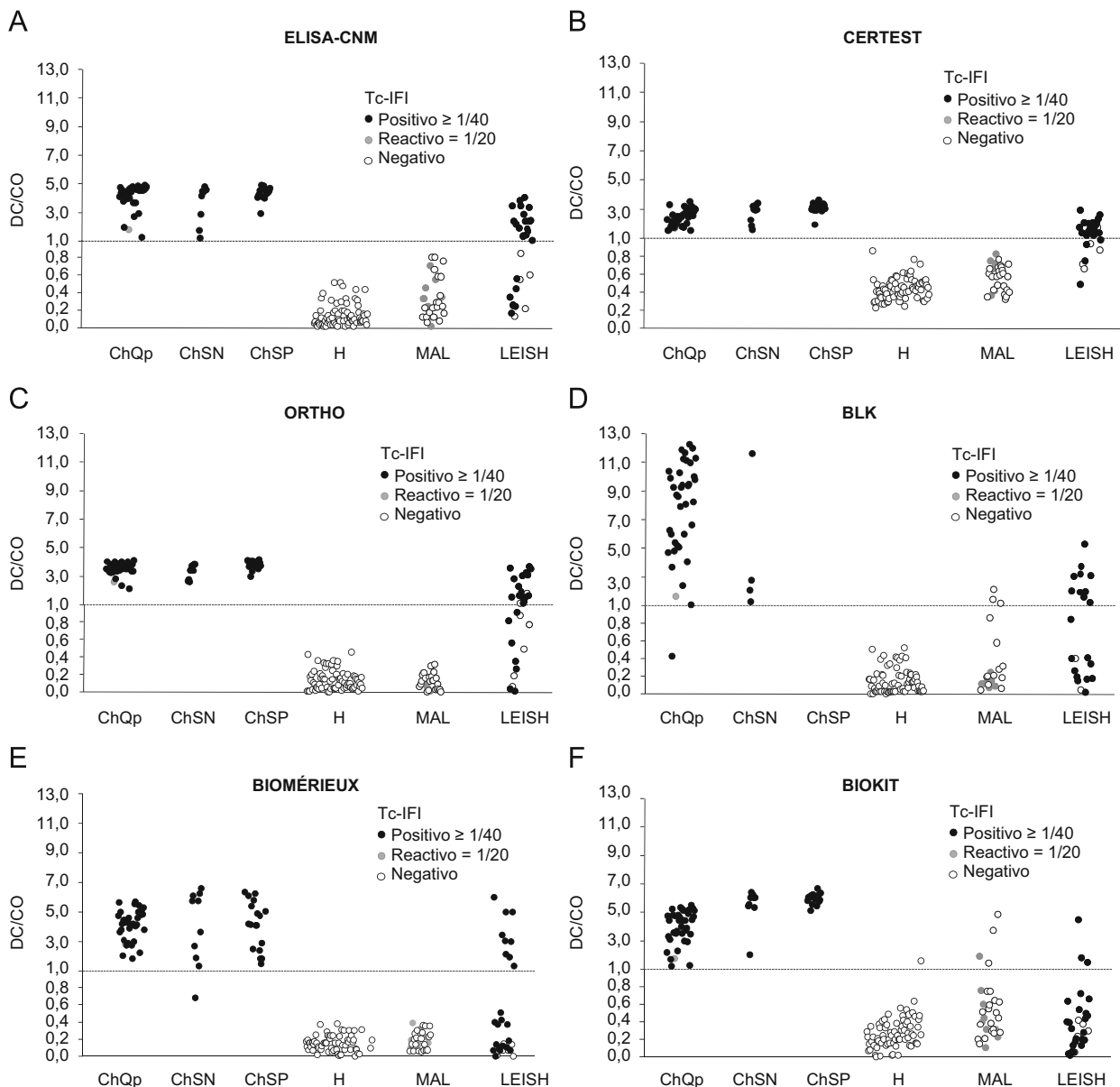
analizaron en primer lugar los resultados de los paneles 1 y 2, y se los combinó posteriormente con los del panel 3. De la misma forma, se valoró la concordancia mediante el análisis del índice kappa ( $\kappa$ ). La clasificación de los sueros del panel 1 en las categorías chagásico y no chagásico se estableció según la descripción de la empresa QPanel. En el panel 2, la categorización se definió mediante la combinación de los resultados de IFI-CNM, ELISA-CNM y los datos clinicoepidemiológicos: IFI-CNM positivo+ELISA-CNM positivo+procedencia de zona endémica o clínica compatible o diagnóstico parasitológico positivo por PCR=chagásico; ausencia de signos y síntomas de la enfermedad de Chagas u otra enfermedad+IFI-CNM negativo+ELISA-CNM negativo=no chagásico o control sano. Los resultados de los sueros del panel 3 se utilizaron para evaluar el grado de reactividad cruzada de cada prueba y su impacto en los índices diagnósticos. En este último

análisis, todos los resultados obtenidos con el panel 3 se agruparon a los de los no chagásicos o controles sanos.

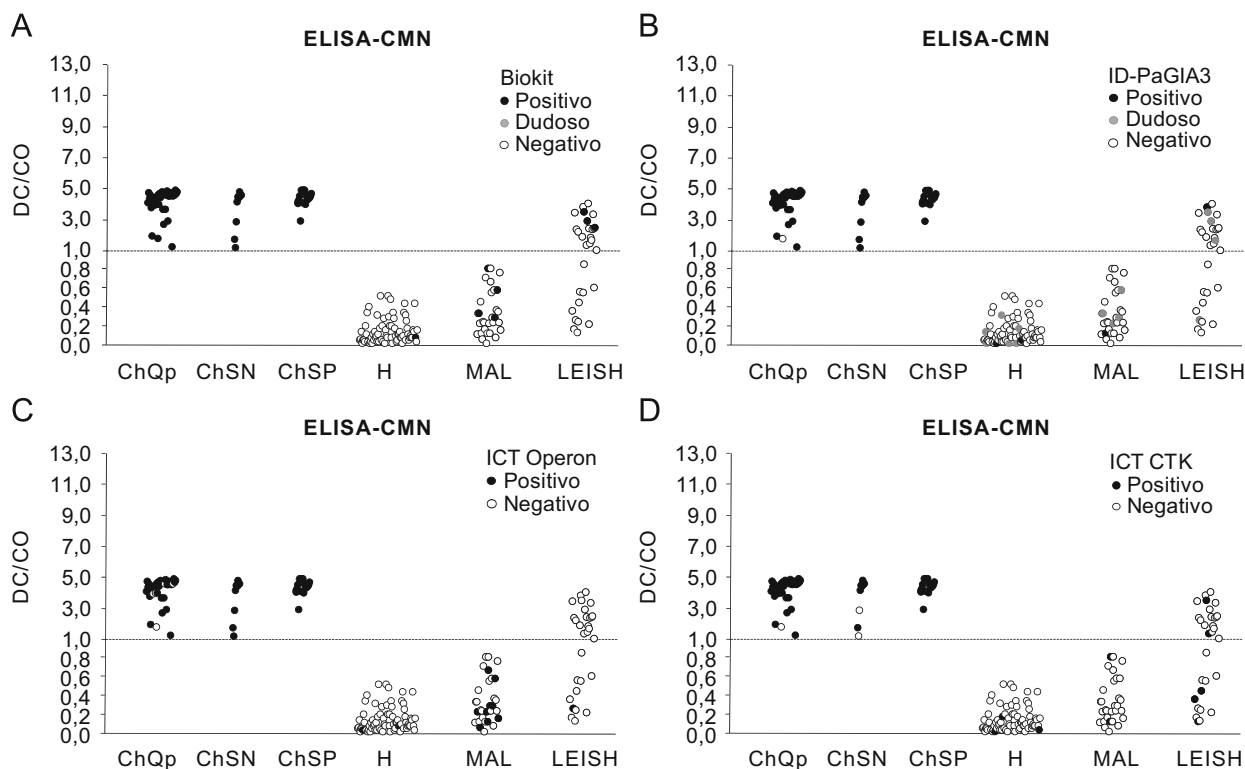
## Resultados

### Comparación de la reactividad

El 92% (61/66) de los sueros de individuos chagásicos fueron reactivos en todas las pruebas (tabla 3), los resultados falsamente negativos correspondieron a sueros del panel elaborado por la empresa QPanel, a sueros con niveles de anticuerpos próximos al CO en algunos ensayos de ELISA o a sueros de individuos con parasitemia indetectable (tabla 4, figs. 1 y 2). Por otra parte, el 97% (94/97) de los sueros de los controles sanos presentaron



**Figura 1.** Comparación de los niveles de anticuerpos observados en los diferentes ensayos de enzoinmunoanálisis con respecto a la inmunofluorescencia indirecta. Línea discontinua: CO. (ChQP: chagásicos diagnosticados en zona endémica; ChSN: seropositivos con PCR negativa, ChSP: seropositivos con PCR positiva; CO: *cut-off* umbral de reactividad; DO: densidad óptica; H: controles sanos; LEISH: pacientes con leishmaniasis visceral; MAL: pacientes con malaria).



**Figura 2.** Comparación de los niveles de anticuerpos observados en el enzoinmunoanálisis-Centro Nacional de Microbiología con respecto a las pruebas no convencionales. Línea discontinua: CO. (ChQP: chagásicos diagnosticados en zona endémica; ChSN: seropositivos con PCR negativa; ChSP: seropositivos con PCR positiva; CO: *cut-off* 'umbral de reactividad'; DO: densidad óptica; H: controles sanos; LEISH: pacientes con leishmaniasis visceral; MAL: pacientes con malaria).

resultados negativos en todas las pruebas. Sólo las pruebas no convencionales presentaron resultados falsamente positivos, estos resultados no fueron concordantes entre sí (tabla 4).

#### Índices diagnósticos

Todas las pruebas mostraron sensibilidad elevada (tabla 5). Las pruebas convencionales presentaron una sensibilidad desde el 98 al 100% y las no convencionales desde el 92 al 100%. Las pruebas rápidas fueron las que exhibieron menor sensibilidad. La especificidad en general fue elevada en todos los ensayos y fluctuaban los valores calculados entre el 97 y el 100%.

#### Impacto de la reactividad cruzada en los índices diagnósticos

Todos los ensayos convencionales presentaron reactividad cruzada con los sueros de leishmaniasis, que variaba entre el 30 y el 83%, y que fue considerablemente menor en los ensayos no convencionales (0 a 17%) (tabla 3). Sin embargo, todas las pruebas que mostraron menor reactividad cruzada con los sueros de leishmaniasis exhibieron reactividad cruzada con los sueros de MAL (3 al 30%) (tabla 3). El grado de reactividad fue bastante amplio, en especial en las muestras de los individuos con leishmaniasis, y presentaba títulos de IFI y valores de densidad óptica elevados (fig. 1). Otros sueros presentaron resultados dudosos tanto por IFI como por prueba de aglutinación en gel (tabla 3, figs. 1 y 2). Al calcular nuevamente los índices diagnósticos, incluidos los datos obtenidos con los sueros de leishmaniasis y MAL, las pruebas convencionales presentaron menor especificidad, en un rango entre el 84 y el 94%. En cambio, las pruebas no convencionales presentaron valores próximos a los obtenidos en el anterior análisis, del 92 al 99% (tabla 5), y superiores a las convencionales.

#### Análisis de la concordancia

La concordancia entre los ensayos convencionales y no convencionales fue elevada cuando se analizó el conjunto de resultados obtenidos con los sueros correspondientes a individuos chagásicos y no chagásicos. Los índices  $\kappa$  variaron entre 0,86 y 0,99 (tabla 6). Cuando se incluyeron los resultados obtenidos con los sueros de leishmaniasis y MAL, los índices  $\kappa$  se situaron entre 0,62 y 0,98 (datos no mostrados). Mediante el análisis de la concordancia se pudo descartar el problema de reactividad cruzada con malaria. Este mismo análisis no fue suficiente para discriminar las reacciones cruzadas con leishmaniasis (fig. 1). Se observó una mejor discriminación cuando se combinaron Biokit con la IFI (fig. 1) o los ELISA convencionales con las pruebas no convencionales (fig. 2).

#### Detección de anticuerpos anti-*Leishmania* en los sueros chagásicos

Como el problema principal de todos los ensayos convencionales de detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* es la reactividad cruzada con los sueros de pacientes con leishmaniasis, se decidió valorar la utilidad de los ensayos IFI-*Leishmania* y ELISA-rk39 en el diagnóstico diferencial con esta enfermedad. Con el primer ensayo fueron positivos 21 (32%) de los 66 sueros de individuos chagásicos. No obstante, más del 50% de los sueros (12/21) presentaron títulos en el límite de positividad (1/80). En cambio, con el ensayo ELISA-rk39 todos los individuos chagásicos fueron negativos (fig. 3). Es importante mencionar que los 4 sueros de individuos con LEISH, que presentaron resultados negativos en el ELISA-rk39, correspondían a muestras con títulos bajos de IFI-*Leishmania*. Estos pacientes tenían un diagnóstico parasitológico positivo y se encontraban inmunodeprimidos (3 eran VIH positivos y uno había recibido un tratamiento con inmunosupresores).

**Tabla 5**  
Sensibilidad y especificidad de las pruebas de detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi*

	Chagásicos N.º positivos (total sueros)	Sensibilidad (IC del 95%)	No chagásicos N.º positivos (total sueros)	Especificidad 1 <sup>a</sup> (IC del 95%)	Otras enfermedades N.º de positivos (total sueros)	Especificidad 2 <sup>b</sup> (IC del 95%)
IFI-CNM	65 (66)	98,5 (94,8-100)	0 (97)	100 (99,5-100)	23 (60)	85,4 (79,5-91,2)
ELISA-CNM	66 (66)	100 (99,2-100)	0 (97)	100 (99,5-100)	18 (60)	88,5 (83,2-93,8)
Certest	66 (66)	100 (99,2-100)	0 (97)	100 (99,5-100)	25 (60)	84,1 (78,0-90,1)
Ortho	66 (66)	100 (99,2-100)	0 (97)	100 (99,5-100)	18 (60)	88,5 (83,2-93,8)
BLK	41 (42)	97,6 (91,8-100)	0 (74)	100 (99,3-100)	13 (60)	90,3 (84,9-95,7)
bioMérieux	66 (66)	98,5 (94,8-100)	0 (97)	100 (99,5-100)	9 (60)	94,3 (90,3-98,2)
Biokit	66 (66)	100 (99,2-100)	1 (97)	99 (96,4-100)	7 (60)	94,9 (91,2-98,7)
ID-PaGIA2	61 (66)	92,4 (85,3-99,6)	1 (97)	99 (96,4-100)	1 (60)	98,7 (96,7-100)
ID-PaGIA3	65 (66)	98,5 (94,8-100)	2 (97)	97,9 (94,6-100)	2 (60)	98,1 (95,6-100)
ICT Operon	61 (66)	92,4 (85,2-99,6)	2 (97)	97,9 (94,6-100)	10 (60)	92,4 (85,3-99,6)
ICT CTK	63 (66)	95,5 (89,7-100)	3 (97)	96,9 (93-100)	9 (60)	93 (88,7-97,3)

CNM: Centro Nacional de Microbiología; ELISA: enzimoimmunoanálisis; ICT: prueba inmunocromatográfica (*immunochromatographic test*); ID-PaGIA2: prueba de aglutinación en gel, versión con 2 péptidos; ID-PaGIA3: prueba de aglutinación en gel, versión con 3 péptidos; IC: intervalo de confianza; IFI: inmunofluorescencia indirecta.

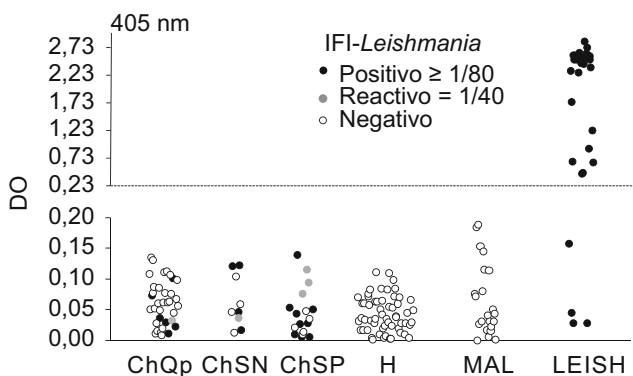
<sup>a</sup> Especificidad calculada a partir de los datos de individuos no chagásicos (controles sanos).

<sup>b</sup> Especificidad calculada teniendo en cuenta los resultados de todos los individuos no chagásicos de todos los paneles (controles sanos, leishmaniasis y malaria).

**Tabla 6**  
Evaluación de la concordancia mediante el estadístico kappa

	IFI-CNM	ELISA-CNM	Certest	Ortho	BLK	bio-Mérieux	Biokit	ID-PaGIA2	ID-PaGIA3	ICTOPERON
ELISA-CNM	0,99									
Certest	0,99	1								
Ortho	0,99	1	1							
BLK	0,96	0,98	0,98	0,98						
bioMérieux	0,97	0,99	0,99	0,99	0,96					
Biokit	0,98	0,99	0,99	0,99	0,96	0,98				
ID-PaGIA 2	0,94	0,92	0,92	0,92	0,90	0,91	0,91			
ID-PaGIA 3	0,98	0,96	0,96	0,96	0,92	0,95	0,95	0,94		
ICT Operon	0,92	0,91	0,91	0,91	0,85	0,90	0,90	0,91	0,90	
ICT CTK	0,94	0,92	0,92	0,92	0,89	0,94	0,91	0,87	0,94	0,86

CNM: Centro Nacional de Microbiología; ICT: prueba inmunocromatográfica (*immunochromatographic test*); ID-PaGIA2: prueba de aglutinación en gel, versión con 2 péptidos; ID-PaGIA3: prueba de aglutinación en gel, versión con 3 péptidos; IFI: inmunofluorescencia indirecta.



**Figura 3.** Comparación de los niveles de anticuerpos mediante enzimoimmunoanálisis-rk39 e inmunofluorescencia indirecta-*Leishmania*. Línea discontinua: CO (ChQp: chagásicos diagnosticados en zona endémica; ChSN: seropositivos con PCR negativa; ChSP: seropositivos con PCR positiva; CO: *cut-off* umbral de reactividad); DO: densidad óptica; H: controles sanos; LEISH: pacientes con leishmaniasis visceral; MAL: pacientes con malaria).

## Discusión

Desde el punto de vista del diagnóstico de laboratorio, la infección por *T. cruzi* es una entidad compleja, en la que su

evolución natural marca la eficacia del diagnóstico parasitológico y serológico. La demostración del parásito es efectiva principalmente en la fase aguda. Desafortunadamente, el 98% de los afectados se diagnostica en la fase crónica. En esta fase, la herramienta que permite demostrar la infección por este protozoo es, principalmente, la determinación de los anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* específicos.

Aunque se han realizado numerosos estudios para evaluar las distintas pruebas de detección de anticuerpos específicos anti-*T. cruzi*<sup>17-19</sup>, no existe consenso en la elección de una técnica de referencia. Los estudios realizados en el Cono Sur de Sudamérica reportan una eficacia elevada de los kits comerciales fabricados en esta región<sup>18,20</sup>. En cambio, los trabajos llevados a cabo en el norte de Sudamérica y Centroamérica muestran que la utilización de antígenos preparados a partir de las cepas de *T. cruzi* que se aíslan en estas zonas incrementa la sensibilidad de los ensayos de detección de anticuerpos<sup>21,22</sup>. Este hecho se basa en el predominio del genotipo *T. cruzi* I en estas regiones<sup>23,24</sup> y la amplia extensión del genotipo *T. cruzi* II en los países del Cono Sur<sup>25</sup>. Otros autores postulan que esta diferencia en la distribución geográfica de los genotipos de *T. cruzi* a su vez influye en la variabilidad de la respuesta inmunitaria de los individuos infectados<sup>26</sup>. Por esto, algunos investigadores de Brasil y Estados Unidos plantearon la posibilidad de que las pruebas antígeno de excreción/secreción de tripomatigotes (TESA, *trypomatigotes excreted-secreted antigen*)-

blot<sup>27</sup> o prueba de radioinmunoprecipitación (RIPA, *radioimmuno-precipitation assay*)<sup>28</sup> pudieran considerarse como pruebas de referencia. Sin embargo, otros autores han demostrado que estas técnicas también presentan resultados falsos negativos y problemas de reactividad cruzada<sup>29–31</sup>. Además, debido a las limitaciones técnicas para su comercialización, la utilización de estas herramientas está restringida a los centros en los que se desarrollaron.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, la confirmación de laboratorio de una sospecha clínica de enfermedad de Chagas sigue basándose en los resultados concordantes de al menos 2 técnicas inmunológicas de principios y antígenos distintos<sup>1</sup>.

En España el origen de la población extranjera latinoamericana es muy variado. Según el Instituto Nacional de Estadística, en diciembre de 2008 los extranjeros latinoamericanos procedían principalmente de Ecuador (23%), Colombia (16%), Bolivia (13%) y Argentina (10%)<sup>4</sup>. Por otra parte, como el resto de la población española, la población extranjera residente en España está expuesta a las infecciones autóctonas. Una de éstas es la LEISH causada por *L. infantum*, un tripanosomátido que genera una respuesta humoral con una importante activación policlonal, origen de la reactividad cruzada en numerosas técnicas de detección de anticuerpos de enfermedades relacionadas e incluso no relacionadas con esta parasitosis<sup>32</sup>. A este hecho se suma el aumento de los viajes a zonas tropicales y, por lo tanto, el riesgo de infección por otros agentes que producen activación policlonal. Este fenómeno podría interferir con el inmunodiagnóstico de *T. cruzi*, en especial en aquellas técnicas en las que intervienen los anticuerpos IgM. Por estas razones es necesario, en el contexto epidemiológico español, conocer la eficacia de las herramientas comerciales disponibles para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi*.

En general, nuestros resultados confirman los datos obtenidos por otros autores. La sensibilidad de los ELISA es superior con respecto al resto de las pruebas, por lo que estas técnicas serían las más adecuadas para realizar el cribado serológico de la infección por *T. cruzi*.

Aunque actualmente en el mercado español existen *kits* para realizar la prueba de IFI, en este estudio sólo se incluyó una preparada en nuestro laboratorio, que presentó una alta sensibilidad. Sin embargo, una limitación de las pruebas de IFI a la hora de aplicarse como ensayos de rutina, es que dependen de la experiencia técnica del operador en la lectura de la señal. Por esto, su uso como prueba de confirmación se restringe a centros de referencia. Por otra parte, existe controversia en la interpretación de los resultados reactivos a la dilución 1/20, unos consideran que este título debería ser el CO de esta prueba. Sin embargo, hay otros autores para los que este título significa reacción cruzada<sup>19</sup>, como nosotros comprobamos en este estudio.

Debido a la complejidad de la interacción de *T. cruzi* con su hospedador, ningún antígeno recombinante por sí solo ha alcanzado la eficacia de los extractos totales en el inmunodiagnóstico de este protozoo. Generalmente, la composición antigénica de los ensayos basados en antígenos recombinantes incluye una combinación de varios epítomos, que incluso suelen ser los mismos<sup>33</sup>. La influencia de este factor se aprecia en el caso de la prueba de aglutinación en gel: 4 de las 5 muestras con resultados negativos en la versión elaborada con 2 péptidos fueron positivas cuando se realizó la misma prueba con las partículas recubiertas con 3 péptidos (tabla 3). Por otra parte, estos 3 epítomos antigénicos también están incluidos en las pruebas Biokit e ICT: prueba inmunocromatográfica (*immunochromatographic test*); Operon (tabla 2), por lo que otro factor que también influye en la sensibilidad es el formato de fabricación.

Con respecto a las pruebas inmunocromatográficas, existen pocos ensayos en este formato y sólo el Chagas Stat-Pak se validó

en Honduras para utilizarse como herramienta de cribado serológico en bancos de sangre<sup>34</sup>, aunque los mismos autores prefieren aplicarlo principalmente en estudios de campo (comunicación personal). Según los resultados obtenidos, las pruebas inmunocromatográficas incluidas en este estudio no alcanzan índices diagnósticos que avalen su incorporación en bancos de sangre. Sin embargo, la facilidad de su uso en la rutina diaria es indiscutible, puesto que estas pruebas no requieren infraestructura sofisticada ni personal especializado. Es decir, en circunstancias en las que es necesaria una actuación inmediata, como son el momento del parto de una gestante de áreas endémicas o el trasplante de órganos de donantes con factores de riesgo para la infección por *T. cruzi*, estas pruebas permitirían la identificación rápida de los portadores infectados de alto riesgo. No obstante, tras el uso de esta prueba, todos los resultados (tanto positivos como negativos) deberían confirmarse con una segunda prueba de mayor sensibilidad, como por ejemplo un ELISA convencional; de esta manera se realizarían 2 ensayos de principios y antígenos distintos.

Es importante mencionar que con la técnica rápida ELISA BLK se analizó un menor número de sueros de individuos infectados por *T. cruzi*, por lo que el resultado falsamente negativo obtenido con esta prueba redundó en una menor sensibilidad comparada con los demás ensayos de ELISA.

En relación con la especificidad, es necesario mencionar que si bien sólo las pruebas no convencionales presentaron resultados discordantes en la población sana, en la rutina diaria este tipo de resultados también se observan en las pruebas convencionales. Una posible explicación técnica de la presencia de resultados falsamente positivos en el ELISA Bioelisa Chagas Biokit, podría deberse a la composición del conjugado, éste contiene anti-IgM además de anti-IgG humana. Si bien, algunos autores defienden la utilidad diagnóstica de la evaluación de los anticuerpos IgM<sup>35</sup>, éstos pueden generar resultados discordantes por su amplia reactividad<sup>36</sup>. Si bien en España no se puede descartar una posible infección aguda o reciente (período de ventana), el número de individuos en este período es reducido con respecto a lo que se observa en zonas endémicas, por lo que esta sospecha estaría asociada a un recién nacido hijo de una mujer seropositiva, a un viaje reciente (menos de 3 meses) a zona endémica, a cuadros febriles o signos de malestar general tras una transfusión de derivados sanguíneos o al trasplante de órganos infectados. En todas estas situaciones, las herramientas de diagnóstico más adecuadas son las que permiten la detección del parásito<sup>8,37,38</sup>. Por otra parte, gracias a los estudios de seguimiento de casos agudos por accidentes de laboratorio, se conoce que la seroconversión de anticuerpos IgG en individuos inmunocompetentes, se produce a partir del primer mes después de haber estado en contacto con el parásito<sup>39</sup>. Asimismo, el seguimiento de individuos en la fase crónica ha demostrado que el nivel de anticuerpos, por lo general, se mantiene constante si no han recibido tratamiento tripanocida. Por el contrario, los que se han tratado son los que presentan, después de algunos años, resultados discordantes<sup>40</sup>. Como en áreas endémicas los individuos tratados no reciben certificación de esta práctica, es probable que algunos individuos inmigrantes se encuentren en estas circunstancias.

Por otra parte, una de las principales desventajas de los ensayos de detección de anticuerpos es la reactividad cruzada. Muchos autores han reportado este problema con sueros de pacientes con leishmaniasis, MAL y enfermedades autoinmunitarias, entre otras<sup>31</sup>. Por esto, para el estudio de los índices diagnósticos, algunos especialistas recomiendan la inclusión de muestras con evidencia serológica a otras enfermedades<sup>18</sup>. Según estas recomendaciones, incluimos sueros de individuos con leishmaniasis y MAL. Se eligieron estas parasitosis debido a que en evaluaciones previas realizadas en nuestro laboratorio estas



enfermedades fueron las que generaron un mayor número de reacciones falsamente positivas. En efecto, todas las técnicas convencionales tienen una disminución importante en la especificidad con respecto a las no convencionales (tabla 5). Sin el análisis de la información clínicoepidemiológica muchos pacientes con leishmaniasis podrían diagnosticarse erróneamente como infectados por *T. cruzi* o se incluirían en la población de individuos con serología discrepante (tabla 3, fig. 1). Por esto es fundamental que además de la valoración de los datos clínicoepidemiológicos se realice un estudio parasitológico y el seguimiento del individuo a largo plazo.

Desde el punto de vista de un banco de sangre, cualquier problema de reactividad cruzada supone el descarte de la donación y, por lo tanto, la interrupción del riesgo de transmisión de cualquier patógeno. Sin embargo, si se trata de confirmar una sospecha clínica, sólo el seguimiento del individuo permitirá definir el significado de este tipo de resultados.

Dado que en España la población inmigrante puede contraer leishmaniasis, es importante tener en cuenta que la fiebre es un marcador clínico que caracteriza a la infección por *L. infantum*, signo que los portadores crónicos de *T. cruzi* no suelen manifestar. En estos casos, el diagnóstico serológico y diferencial deberá establecerse mediante la detección de anticuerpos anti-rk39, ya que la prueba de IFI-*Leishmania* presenta reactividad cruzada con los sueros de los individuos chagásicos (fig. 3). En situaciones de inmunodepresión, la detección del parásito será siempre la mejor elección.

En conclusión, y teniendo en cuenta nuestros resultados, los ensayos comerciales Ortho® Clinical Diagnostics, Certest/Abbot Laboratories/BiosChile, Biokit y bioMérieux cumplen las expectativas para realizar el cribado serológico de la infección por *T. cruzi*. Como todas las técnicas rápidas examinadas permitieron la confirmación de la sospecha clínica del 92% de los infectados y del 100% de los que presentaban parásitos en sangre periférica, estos ensayos podrían ser de gran utilidad en el cribado serológico de las situaciones particulares ya mencionadas; no obstante, para alcanzar resultados más adecuados deberían combinarse con un ELISA convencional. Por otra parte, como ninguna prueba ni convencional ni no convencional por sí sola puede establecer el diagnóstico o confirmación de la sospecha clínica, ni descarta el problema de la reactividad cruzada, la combinación de un ELISA convencional con uno no convencional puede ser la mejor alternativa para el diagnóstico de rutina. La combinación de pruebas siempre generará resultados discrepantes, por lo general, en un número reducido de casos. Por esto, la estrategia más adecuada para definir el significado de estas discrepancias sería el seguimiento serológico a largo plazo, apoyado de un buen diagnóstico diferencial en centros especializados.

#### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

#### Financiación

Este estudio ha recibido el apoyo del Ministerio de Ciencia e Innovación y el Instituto de Salud Carlos III, en el marco de la Red de Investigación de Enfermedades Tropicales (RETIC-RICET, RD06/0021/0009 y RD06/0021/0019).

#### Agradecimientos

Los autores agradecen a la OPS la donación de los sueros caracterizados por la empresa QPanel, Brasil.

#### Bibliografía

- WHO. Control of Chagas disease. Ginebra: WHO Press; 2002.
- OMS. Reporte sobre la enfermedad de Chagas. Grupo de trabajo científico 17–20 de abril de 2005. Guhl F, Lazdins-Helds J, editores. Buenos Aires-Argentina. [consultado 10/3/2009]. Disponible en: [http://www.who.int/tdr/publications/publications/pdf/swg\\_chagas.pdf](http://www.who.int/tdr/publications/publications/pdf/swg_chagas.pdf).
- Nobrega AA, García MH, Tatto E, Obara MT, Costa E, Sobel J, et al. Oral transmission of Chagas disease by consumption of acai palm fruit, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:653–5.
- Instituto Nacional de Estadística. Avance del Padrón municipal a 1 de enero de 2009. [Consultado 22/10/2009]. Disponible en: <http://www.ine.es/prensa/np551.pdf>.
- Real Decreto 1088/2005, de 16 de septiembre, por el que se establecen los requisitos técnicos y condiciones mínimas de la hemodonación y de los centros y servicios de transfusión. [consultado 10/3/2009]. Disponible en: [http://www.msc.es/profesionales/saludPublica/medicinaTransfusional/legislacion/docs/RD\\_1088-2005.pdf](http://www.msc.es/profesionales/saludPublica/medicinaTransfusional/legislacion/docs/RD_1088-2005.pdf).
- Castro E. Transfusión sanguínea y enfermedad de Chagas: iniciativas en Centros de Transfusión de España. *Enf Emerg.* 2006;8:48–50.
- Villalba R, Fornes G, Álvarez MA, Roman J, Rubio V, Fernández M, et al. Acute Chagas' disease in a recipient of a bone marrow transplant in Spain: Case report. *Clin Infect Dis.* 1992;14:594–5.
- Flores-Chávez M, Fernández B, Puente S, Torres P, Rodríguez M, Monedero C, et al. Transfusional chagas disease: Parasitological and serological monitoring of an infected recipient and blood donor. *Clin Infect Dis.* 2008;46:e44–7.
- Del Pino M, Coll O. Enfermedad de Chagas, transmisión materno fetal y experiencia recogida en nuestro centro. *Enf Emerg.* 2006;8:37–9.
- Muñoz J, Coll O, Juncosa T, Verges M, Del Pino M, Fumado V, et al. Prevalence and vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* infection among pregnant Latin American women attending 2 maternity clinics in Barcelona, Spain. *Clin Infect Dis.* 2009;48:1736–40.
- Paricio-Talayero JM, Benlloch-Muncharaz MJ, Collar-del-Castillo JI, Rubio-Soriano A, Serrat-Perez C, Magraner-Egea J, et al. Epidemiological surveillance of vertically-transmitted Chagas disease at three maternity hospitals in the Valencian Community. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008;26:609–13.
- Salvado E, Pinazo MJ, Muñoz J, Alonso D, Naniche D, Mayor A, et al. Clinical presentation and complications of *Plasmodium falciparum* malaria in two populations: Travelers and immigrants. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008;26:282–4.
- Deniau M, Cañavate C, Faraut-Gambarelli F, Marty P. The biological diagnosis of leishmaniasis in HIV-infected patients. *Ann Trop Med Parasitol.* 2003;97:115–33.
- Camargo ME. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1966;8:227–35.
- Scott P, Pearce E, Natovitz P, Sher A. Vaccination against cutaneous leishmaniasis in a murine model. I. Induction of protective immunity with a soluble extract of promastigotes. *J Immunol.* 1987;139:221–7.
- Burns Jr JM, Shreffler WG, Benson DR, Ghali HW, Badaro R, Reed SG. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:775–9.
- Langhi Jr DM, Bordin JO, Castelo A, Walter SD, Moraes-Souza H, Stumpf RJ. The application of latent class analysis for diagnostic test validation of chronic *Trypanosoma cruzi* infection in blood donors. *Braz J Infect Dis.* 2002;6:181–7.
- 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;14:1045–9.
- Leiby DA, Wendel S, Takaoka DT, Fachini RM, Oliveira LC, Tibbals MA. Serologic testing for *Trypanosoma cruzi*: Comparison of radioimmunoprecipitation assay with commercially available indirect immunofluorescence assay, indirect hemagglutination assay, and enzyme-linked immunosorbent assay kits. *J Clin Microbiol.* 2000;38:639–42.
- Gomes YM, Pereira VR, Nakazawa M, Rosa DS, Barros MD, Ferreira AG, et al. Serodiagnosis of chronic Chagas infection by using EIE-recombinant-Chagas-biomanguinhos kit. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001;96:497–501.
- Enciso C, Montilla M, Santacruz MM, Nicholls RS, Rodríguez A, Mercado M, et al. Comparison of the indirect immunofluorescent (IFAT), ELISA test and the commercial Chagatek test for anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies detection. *Biomedica.* 2004;24:104–8.
- Sánchez B, Monteon V, Reyes PA, Espinoza B. Standardization of micro-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot for detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies using extracts from Mexican strains as antigens. *Arch Med Res.* 2001;32:382–8.
- Triana O, Ortiz S, Dujardin JC, Solari A. *Trypanosoma cruzi*: Variability of stocks from Colombia determined by molecular karyotype and minicircle Southern blot analysis. *Exp Parasitol.* 2006;113:62–6.
- Bosseno MF, Barnabe C, Magallon GE, Lozano KF, Ramsey J, Espinoza B, et al. Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Mexico. *J Clin Microbiol.* 2002;40:627–32.
- Miles MA, Feliciangeli MD, De Arias AR. American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *BMJ.* 2003;326:1444–8.

26. Campbell DA, Westenberger SJ, Sturm NR. The determinants of Chagas disease: Connecting parasite and host genetics. *Curr Mol Med.* 2004;4:549–62.
27. Umezawa ES, Nascimento MS, Kesper Jr N, Coura JR, Borges-Pereira J, Junqueira AC, et al. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. *J Clin Microbiol.* 1996;34:2143–7.
28. Winkler MA, Brashear RJ, Hall HJ, Schur JD, Pan AA. Detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* among blood donors in the southwestern and western United States. II. Evaluation of a supplemental enzyme immunoassay and radioimmunoprecipitation assay for confirmation of seroreactivity. *Transfusion.* 1995;35:219–25.
29. Amato-Neto V, De Marchi CR, Ferreira CS, Ferreira AW. Observations on the use of TESA blot for the serological diagnosis of Chagas' disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005;38:534–5.
30. Chang CD, Cheng KY, Jiang LX, Salbilla VA, Haller AS, Yem AW, et al. Evaluation of a prototype *Trypanosoma cruzi* antibody assay with recombinant antigens on a fully automated chemiluminescence analyzer for blood donor screening. *Transfusion.* 2006;46:1737–44.
31. Wendel S. Transfusion-transmitted American and African trypanosomiasis (Chagas disease and sleeping sickness): Neglected or reality?. *ISBT Science Series.* 2006;1:140–51.
32. Salinas A, Gorgolas M, Fernández-Guerrero M. Refrain from telling bad news: Patients with leishmaniasis can have false-positive HIV test results. *Clin Infect Dis.* 2007;45:139–40.
33. Da Silveira JF, Umezawa ES, Luquetti AO. Chagas disease: Recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends Parasitol.* 2001;17:286–91.
34. Ponce C, Ponce E, Vinelli E, Montoya A, De Aguilar V, González A, et al. Validation of a rapid and reliable test for diagnosis of chagas' disease by detection of *Trypanosoma cruzi*-specific antibodies in blood of donors and patients in Central America. *J Clin Microbiol.* 2005;43:5065–8.
35. Corral RS, Altcheh JM, Freilij HL. Presence of IgM antibodies to *Trypanosoma cruzi* urinary antigen in sera from patients with acute Chagas' disease. *Int J Parasitol.* 1998;28:589–94.
36. Boes M. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Mol Immunol.* 2000;37:1141–9.
37. Riera C, Guarro A, Kassab HE, Jorba JM, Castro M, Angrill R, et al. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Europe (Spain): A case report. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75:1078–81.
38. Brisseau JM, Cebron JP, Petit T, Marjolet M, Cuilliere P, Godin J, et al. Chagas' myocarditis imported into France. *Lancet.* 1988;1:1046.
39. Herwaldt BL. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14:659–88.
40. Luquetti A, Rassi A. Perspectiva del uso de la serología (Ag naturales y otros) en la evaluación de la eficacia del tratamiento etiológico. [consultado 10/3/2009]. Disponible en: <http://www.fac.org.ar/fec/chagas2/llave/c003/luque.htm>.