



**Tesis de Maestría**  
**Evaluación de Prueba ICT Chagas  
con sangre total humana**

**Maestría en Microbiología Molecular**  
**Universidad Nacional de San Martín**  
**ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"**  
**Febrero 2017**

**Bioquímica Karenina Scollo**

**Directora de Tesis: Dra. Miriam Postan**

**Co-director: Dr. Marcelo Rodríguez**

# Índice

<b>Agradecimientos.....</b>	<b>5</b>
<b>Definiciones y Abreviaturas.....</b>	<b>6</b>
<b>1.Introducción.....</b>	<b>12</b>
1.1 Epidemiología de la enfermedad de Chagas.....	13
1.2 Agente etiológico.....	16
1.3 Ciclo vital de <i>Trypanosoma cruzi</i> y transmisión de la infección.....	17
1.4 Vector del <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	20
1.5 Linaje del <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	21
1.6 Fases de la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	23
1.7 Diagnóstico de la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	26
1.7.1 Métodos parasitológicos.....	26
1.7.2 Métodos serológicos.....	27
1.7.3 Métodos moleculares.....	29
1.7.4 Interpretación del Diagnóstico de laboratorio.....	30
1.7.4.1 Diagnóstico serológico de infección por <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	30
1.7.4.2 Tamizaje.....	31

1.7.4.2.1 Tamizaje en bancos de sangre .....	32
1.7.4.2.2 Tamizaje poblacional.....	32
<b>2. Antecedentes del estudio.....</b>	<b>34</b>
<b>3. Objetivo del estudio.....</b>	<b>36</b>
<b>4. Materiales y Métodos.....</b>	<b>37</b>
4.1Diseño experimental y Población de estudio.....	37
4.2 Criterios de Inclusión y Exclusión.....	38
4.3 Aprobación ética y Consentimiento Informado.....	39
4.4 Diagrama del estudio.....	39
4.5 Tests empleados en el estudio.....	42
4.5.1 Test ICT Chagas.....	42
4.5.2 Chagas STAT-Pack.....	44
4.5.3 Realización de los tests.....	44
4.6 Aseguramiento de la calidad.....	47
4.8 Análisis estadístico.....	47
<b>5. Resultados.....</b>	<b>49</b>
5.1 Selección de la Población de estudio.....	49
5.1.1 Procedencia de la población de estudio.....	51

5.2 Estandarización y evaluación del rendimiento del Test ICT Chagas con el estándar de referencia.....	<b>52</b>
5.2.1 Rendimiento del ICT Chagas a diferentes tiempos de lectura utilizando sangre capilar.....	<b>53</b>
5.2.2 Rendimiento del Test ICT Chagas en sangre entera con EDTA y suero.....	<b>55</b>
5.3 Rendimiento del Test CHAGAS STAT - PAK en sangre entera obtenida con EDTA.....	<b>57</b>
5.4 Rendimiento del Test ICT Chagas en relación al área de riesgo de infección por <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	<b>58</b>
<b>6. Discusión.....</b>	<b>67</b>
<b>7. Conclusión.....</b>	<b>75</b>
<b>8. Bibliografía.....</b>	<b>77</b>
ANEXO I .....	87
ANEXO II .....	92

## **Agradecimientos**

A mi familia por alentarme, apoyarme y acompañarme en cada momento de mi vida. Por enseñarme y mostrarme los valores con los que hoy practico mi profesión y por los que considero una causa de lucha.

A mis amigas, que acompañaron cada etapa del proyecto con su aliento y consejos.

A Nahuel por los mates, tarde de estudios y acompañarme en cada momento.

A las autoridades del INP/ANLIS, Dr. Sergio Sosa Estani, Dr. Andrés Mariano Ruiz, Dra. Monica Esteva, Dra. Nilda Prado y Dra. Cristina Maidana por su apoyo y colaboración en este proyecto. A mis compañeros del Departamento de Diagnóstico por ser parte en cada etapa de este proyecto y hacer que fuera posible.

A la Dra. Miriam Postan por confiar en mí, por sus enseñanzas y por su total disposición como directora en este trabajo. .

Al Dr. Marcelo Rodriguez y Dra Lucia Irazu por la colaboración brindada en el proyecto y sus conocimientos aportados.

## Definiciones y Abreviaturas

**Criterio de exactitud diagnóstica:** El mejor criterio disponible para establecer la presencia o ausencia de la condición, evento o característica de interés utilizando un método único o combinación de métodos (ensayos de laboratorios, estudios por imágenes, patología e información clínica incluyendo el seguimiento).

**Sensibilidad (S):** El porcentaje de sujetos con la condición de estudio cuyos resultados son positivos.

NOTA: Un estimado de la sensibilidad se calcula como  $100 \times TP / (TP+FN)$

**Especificidad (E):** El porcentaje de sujetos sin la condición de estudio cuyos resultados son negativos.

NOTA: Un estimado de la sensibilidad se calcula como  $100 \times TN / (FP+TN)$

**Intervalos de confianza (IC):** es el intervalo de valores donde se estima que se encuentra el valor verdadero de un resultado con una probabilidad determinada. Ejemplo: intervalo de confianza del 95%.

**Método de referencia:** Método aceptado por la comunidad médica como el mejor método de diagnóstico disponible.

**Prevalencia:** Es la frecuencia de una condición de interés expresada como porcentaje de individuos con la condición respecto al total de individuos (aquellos con la condición más aquellos sin la condición de interés) en la población en estudio.

NOTA: Un estimado de prevalencia se calcula como  $100 \times (VP+FN) / (VP+FP+FN+VN)$ .

**Valor predictivo positivo (VPP):** El porcentaje de sujetos con un resultado positivo que tienen la condición de estudio.

NOTA: Un estimado de VPP se calcula como  $100 \times VP / (VP+FP)$ .

**Valor predictivo negativo (VPN):** El porcentaje de sujetos con un resultado negativo que no tienen la condición de estudio.

NOTA: Un estimado de VPN se calcula como  $100 \times VN / (VN+FN)$ .

**Índice Kappa (k):** Permite evaluar el grado de acuerdo entre dos variables dicotómicas. La siguiente tabla indica la interpretación de los valores de índice Kappa según el rango de valores obtenidos.

kappa	Grado de acuerdo
<0	sin acuerdo
0 – 0,2	insignificante
0,2 – 0,4	bajo
0,4 – 0,6	moderado
0,6 – 0,8	bueno
0,8 - 1	muy bueno

**Test MacNemar (Z):** Es una prueba no paramétrica de comparación de proporciones para dos muestras relacionadas. Debe cumplir las siguientes características:

- Los datos se ajustan a la distribución de chi cuadrada.
- Nivel nominal de la variable dependiente.

•Su función es comparar el cambio en la distribución de proporciones entre dos mediciones de una variable dicotómica y determinar que la diferencia no se deba al azar (que la diferencia sea estadísticamente significativa; Juárez, Villatoro & López, 2011).

Cuando el valor Z obtenido es mayor al valor Z tabla se considera que no hay diferencias entre los métodos evaluados.

**Razón de verosimilitud:** La **razón de verosimilitud positiva (RV+)** indica la probabilidad de que un test específico resulte positivo cuando una persona presenta la enfermedad en estudio. La **razón de verosimilitud negativa (RV-)** indica la probabilidad de que un test específico resulte negativo en ausencia de la enfermedad. Este parámetro de valoración de una prueba diagnóstica es una herramienta que provee una ventaja con respecto a los valores predictivos positivos y negativos de un test debido a que, a diferencia de estos, no dependen de la proporción de personas que presentan la enfermedad en estudio sino de la sensibilidad y especificidad del test; de ahí su utilidad para comparar pruebas diagnósticas. Si la razón de verosimilitud es igual a 1, la probabilidad de diagnóstico es la misma antes que después de aplicar el test específico, en este caso, el test es inútil por no tener capacidad de discriminación. **La RV+ por encima de 10 y la RV- por debajo de 0,1 se consideran que proveen una fuerte evidencia para descartar o no una enfermedad en la mayoría de los casos (Deeks, J. y Altman, D. 2009).**

Interpretación de las Razones de Verosimilitud Negativa RV(-) y Positiva RV(+)

$RV(+)>10$ y $RV(-)<0.1$	Test excelente. Capacidad diagnóstica del test SUFICIENTE.
$5<RV(+)<10$ y $0.1<RV(-)<0.2$	Test Bueno. Capacidad diagnóstica del test MODERADA.
$2<RV(+)<5$ y $0.2<RV(-)<0.5$	Test Regular. Capacidad diagnóstica del test ESCASA.
$1<RV(+)<2$ y $0.5<RV(-)<1$	Test Inútil. Capacidad diagnóstica del test INSIGNIFICANTE.

APG: Aglutinación de Partículas

BPL: Buenas Prácticas de Laboratorio

CMIA: Inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

E: Especificidad

EDTA: Acido etilendiaminotetraacético

ELISA: Enzimoimmunoensayo

FN: Falso Negativo

FP: Falso Positivo

HAI: Hemoaglutinación Indirecta

IC: Intervalo de Confianza

ICT: Tira inmunocromatográfica

IFI: Inmunofluorescencia Indirecta

INP: Instituto Nacional de Parasitología

$\kappa$ : Índice Kappa

MSF: Médicos Sin Fronteras

RV (-): Razón de verosimilitud Negativa

RV (+): Razón de verosimilitud Positiva

S: Sensibilidad

TN: Total Negativos

TP: Total Positivos

WHO: Organización Mundial de la Salud

Z: Test McNemar

## 1. Introducción

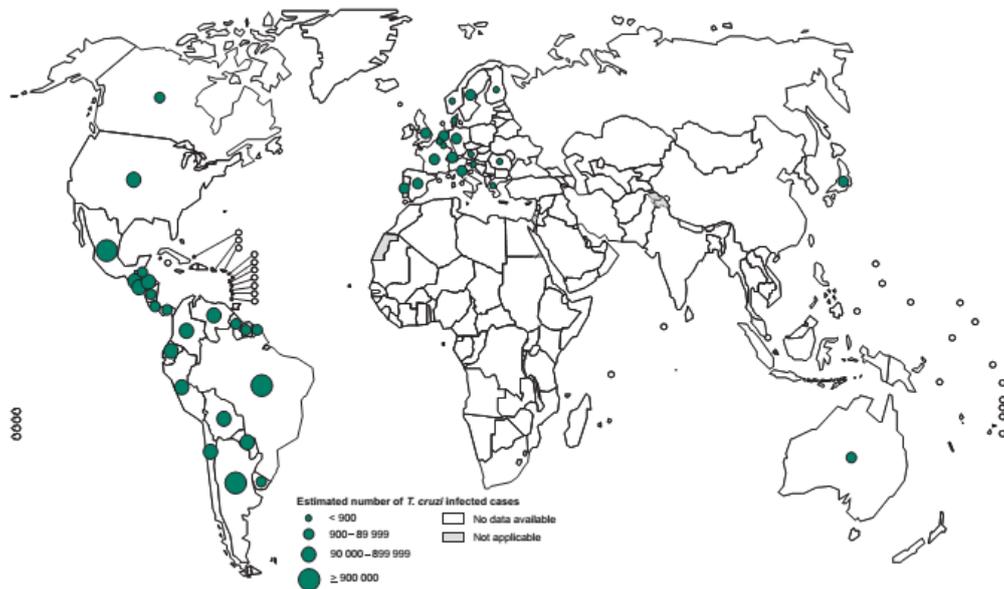
La tripanosomiasis americana es una enfermedad parasitaria endémica en varios países del continente americano. La historia del descubrimiento de esta enfermedad se remonta a 1907, cuando el investigador brasileño Carlos Chagas, descubrió la presencia de parásitos flagelados en el intestino posterior de insectos artrópodos, capturados en el norte del estado de Minas Gerais, Brasil (Chagas, 1909). Este hallazgo fue seguido por una serie de estudios que condujeron a este investigador y sus colaboradores, a la descripción de la enfermedad que hoy lleva su nombre. Aunque existen en la literatura referencias sobre la existencia de insectos similares a los descritos por el autor brasileño y enfermos con sintomatología clínica compatible con la tripanosomiasis americana con anterioridad a Chagas (Guerra, 1970, da Silva, 1985), fue a partir de los estudios de este investigador que se toma conocimiento de la enfermedad como entidad clínico-patológica definida. Años más tarde, Salvador Mazza informó sobre numerosos casos humanos con enfermedad de Chagas en la República Argentina, siendo este descubrimiento el punto de partida de estudios casi simultáneos que demostraron la existencia de *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad, el agente vector y la enfermedad del hombre a través del continente americano. La falta de medios para la prevención eficaz y la curación de la enfermedad, ha determinado que la investigación de enfermedad de Chagas en esta patología sea del interés de los Organismos Gubernamentales Nacionales e Internacionales.

## 1.1 Epidemiología de enfermedad de Chagas

Se pueden reconocer 5 períodos epidemiológicos en la historia de enfermedad de Chagas. El primero corresponde al período pre-homínido; el segundo período enzoótico con su llegada en las Américas (26000-12000 años atrás) donde ocurre la primer infección accidental al humano; el tercer período denominado antropozoonótico (Siglo XVI); el cuarto período que comienza durante el siglo XX con el primer estudio de enfermedad de Chagas y la concepción e implementación de las iniciativas de control para interrupción de la transmisión vectorial y atención a las personas infectadas y el quinto período caracterizado por los cambios del logro del primer control favorecido por el contexto de una economía positiva y de transformación social de los países(WHO, 2015).

Estudios epidemiológicos realizados por la Organización Mundial de la Salud (WHO) en el año 2012 estiman que aproximadamente 10 millones de personas se encuentran actualmente infectadas con *T. cruzi*, más de 65 millones se encuentran bajo el riesgo de ser infectadas cada año, con una incidencia de 28.000 nuevas infecciones anuales y 12,000 personas en América Latina mueren a causa de insuficiencia cardíaca u otro tipo de alteraciones relacionadas a la enfermedad (WHO, 2012, Schofield y col, 2006). La transmisión de la infección humana por vía vectorial se relaciona con la distribución geográfica del vector que se extiende entre los paralelos 42 Norte (Estados Unidos) y 43 Sur (Provincia de Chubut) del continente americano, afectando principalmente 21 países tal como se muestra en la Fig. 1. El insecto es conocido bajo el nombre de “vinchuca” y “chinche” o “pito” en los países del

Sud y Centroamericanos de habla hispana respectivamente, “barbeiro” en Brasil y “kissing bug” en los E. Unidos.

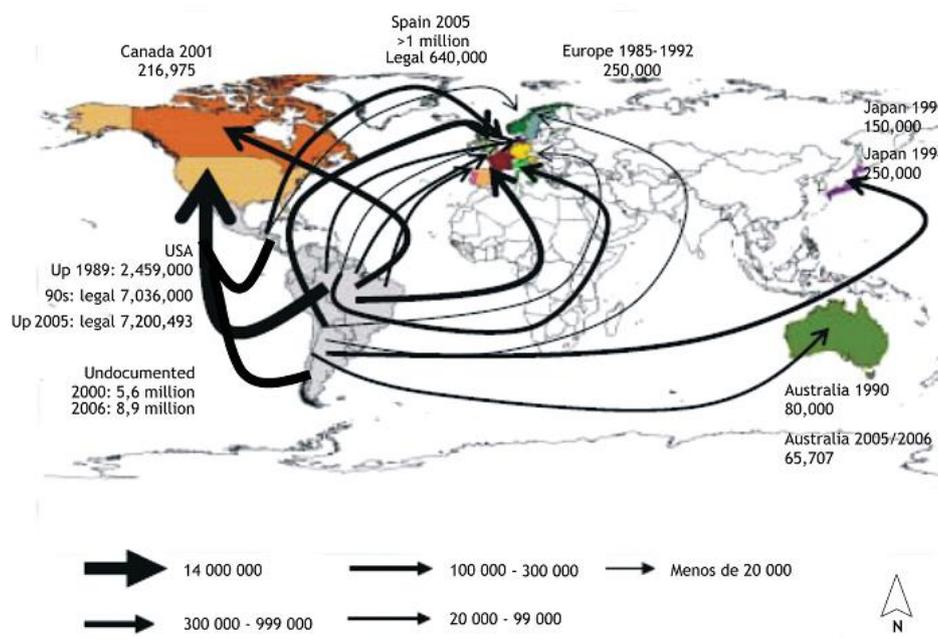


**Figura.1 Distribución de los casos de enfermedad de Chagas según estimaciones oficiales mundial, 2010-2013**

La transmisión de la infección por *T. cruzi* está estrechamente relacionada a las condiciones socio-económicas de la población y ocurre más frecuentemente en las áreas más pobres, con altos índices de analfabetismo, desnutrición y mortalidad infantil, donde la precariedad de la construcción de la vivienda humana favorece el desarrollo del insecto vector (Pinto Días, 1985). Existe una concordancia entre el nivel de educación sanitaria y el uso de insecticidas en el control de los insectos transmisores de la infección por *T. cruzi* que se relacionó con un descenso en los porcentajes de individuos con seropositividad para la infección (Acquatella y col, 1985, Segura y col 1986). Por lo tanto los programas de educación sanitaria y de control de vectores son de utilidad y

tienen gran impacto en el tratamiento de esta enfermedad como problema de salud (Segura y col, 2000).

En las últimas décadas, la privación económica, problemas políticos o ambos han estimulado la migración humana desde países donde la Enfermedad es endémica hacia países desarrollados. Los principales destinos de la migración de países de Latinoamérica incluyen Estados Unidos de América, España, Japón, Canadá y Australia y tal como se muestra en la fig. 2. En estos países no endémicos, la vía principal de transmisión son las transfusiones de sangre y la vía congénita (Schmunis, 2007).



**Figura. 2: Flujo de inmigración de Latinoamérica. Fuente: tomado de Schmunis, 2007.**

En base a datos oficiales, se estima que en Argentina hay 1.350.000 personas infectadas con *T. cruzi*, de las cuales 337.500 personas podrían desarrollar cardiopatía chagásica crónica y/o formas digestivas de la enfermedad

(Programa Nacional de Chagas, 2012). En 2011 se comenzó a implementar el Plan Estratégico Nacional de Chagas 2011-2016, cuyos objetivos son interrumpir la transmisión del *Trypanosoma cruzi* y reducir la morbi-mortalidad por enfermedad de Chagas y su impacto socioeconómico (Programa Nacional de Chagas, 2012). Como se observa en la Tabla I, durante su primer año de ejecución, el plan tuvo un importante impacto sobre la seroprevalencia en la población protegida, en embarazadas, niños menores de 15 años y en el número de casos agudos notificados respecto al año 2003.

**TABLA I. Indicadores de Impacto de enfermedad de Chagas, estimaciones oficiales, 2003-2012**

Indicadores de Impacto	2003		2012
Seroprevalencia por <i>T. cruzi</i> en embarazadas (embarazadas infectadas sobre total de embarazadas)	5,49%		3,26%
Tamizaje serológico para <i>T. cruzi</i> en menores de 15 años residentes en áreas endémicas.	Prevalencia	2,74%	1,17%
	Niños estudiados	19.541	60.000
Población protegida	1.300.000		3.000.000
Notificación de casos agudos vectoriales	18		2

## 1.2 Agente etiológico

El *Trypanosoma cruzi*, es un parásito protozoario (unicelular) de la Clase Mastigophora, Orden kinetoplastida, de la Familia Trypanosomatidae, Género Trypanosoma, Sección Stercoraria, Subgénero Schizotrypanum (Chagas, 1909), especie *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi* (Chagas, 1909, Hoare, 1972, Ruiz AM. y col, 2004).

El parásito se caracteriza por ser digenético en la naturaleza cumpliendo su ciclo evolutivo en dos huéspedes: el huésped intermediario, invertebrado o vector, y el huésped definitivo vertebrado.

El género *Trypanosoma* se divide en dos secciones: *Salivaria* y *Estercoraria* (Hoare CA, 1972). *T. cruzi* pertenece a la segunda y es el único patógeno dentro de esta sección. La principal característica de los organismos clasificados en la sección *Estercoraria* es que son transmitidos por un insecto vector que elimina con sus deyecciones las formas infectantes del parásito.

El orden Kinetoplastida, se caracteriza por la presencia de un kinetoplasto, una estructura que concentra una malla de ADN mitocondrial (30% del ADN del parásito) cerca de la base del flagelo, formando parte integral del sistema mitocondrial.

Como miembro de la familia Trypanosomatidae, se caracteriza por la presencia de un flagelo que emerge de una invaginación llamada bolsillo flagelar, un cuerpo paraflagelar y un kinetoplástido único (Ruiz AM. y col, 2004).

### **1.3 Ciclo de vida de *T. cruzi* y transmisión de la infección**

El *T. cruzi* se mantiene en la naturaleza alternando entre 2 grupos de huéspedes: uno intermediario, que involucra numerosas especies de insectos de la subfamilia Triatominae, familia Reduviidae del orden Hemiptera, de hábitos hematófagos, y otro definitivo que puede ser cualquier mamífero, incluyendo al hombre (Segura E.L. y Ruiz AM. , 1992).

En las zonas endémicas la transmisión de enfermedad de Chagas se produce fundamentalmente por **vía vectorial**. La transmisión del vector al hombre se

facilita debido al hábito del insecto de depositar deyecciones sobre la piel inmediatamente después de alimentarse. Si se trata de un insecto infectado, deposita las deyecciones cargadas de tripomastigotes metacíclicos sobre la piel o las mucosas de un ser humano sano.

Los parásitos atraviesan la piel a través del rascado o penetran activamente a través de las mucosas, invadiendo las células adyacentes. En el interior de éstas, los parásitos se redondean y se diferencian al estadio amastigote, forma bajo la cual se multiplican por división binaria simple. Después de varias generaciones, los amastigotes se diferencian a tripomastigotes, abandonando la célula huésped luego de su lisis, y ganan acceso a la circulación, desde donde invadirán nuevas células del huésped o ser captados durante la alimentación de un insecto vector, completando el ciclo de vida.

Tal como se muestra en la figura 3, el ciclo biológico de *T. cruzi* en el vector comienza cuando un triatomino sano se alimenta de un mamífero infectado, e ingiere tripomastigotes circulantes junto con la sangre. En el tubo digestivo del vector, el parásito se redondea y se diferencia (pasando por amastigote y /o esferomastigote) a epimastigote, el cual se reproduce activamente por división binaria en el intestino medio del insecto. Los epimastigotes finalmente se diferencian a tripomastigotes metacíclicos infectantes en la parte distal de la ampolla rectal y son así eliminados con la deyección. Otra forma de transmisión de la infección que ocurren tanto en zona endémica como no endémicas incluyen: a) transmisión de la madre infectada a su hijo durante el embarazo (transmisión vertical o congénita), b) transfusión de sangre infectada y no controlada, c) trasplante de órganos d) ingesta de parásitos, principalmente por

consumo de alimentos contaminados con heces del vector (aún no se han demostrado casos por esta vía en nuestro país) y e) accidente de laboratorio. También se debe tener presente el potencial riesgo de la práctica de compartir jeringas entre usuarios de drogas inyectables (Guías para la atención del paciente infectado con *Trypanosoma cruzi* (Enfermedad de Chagas), Agosto 2012)

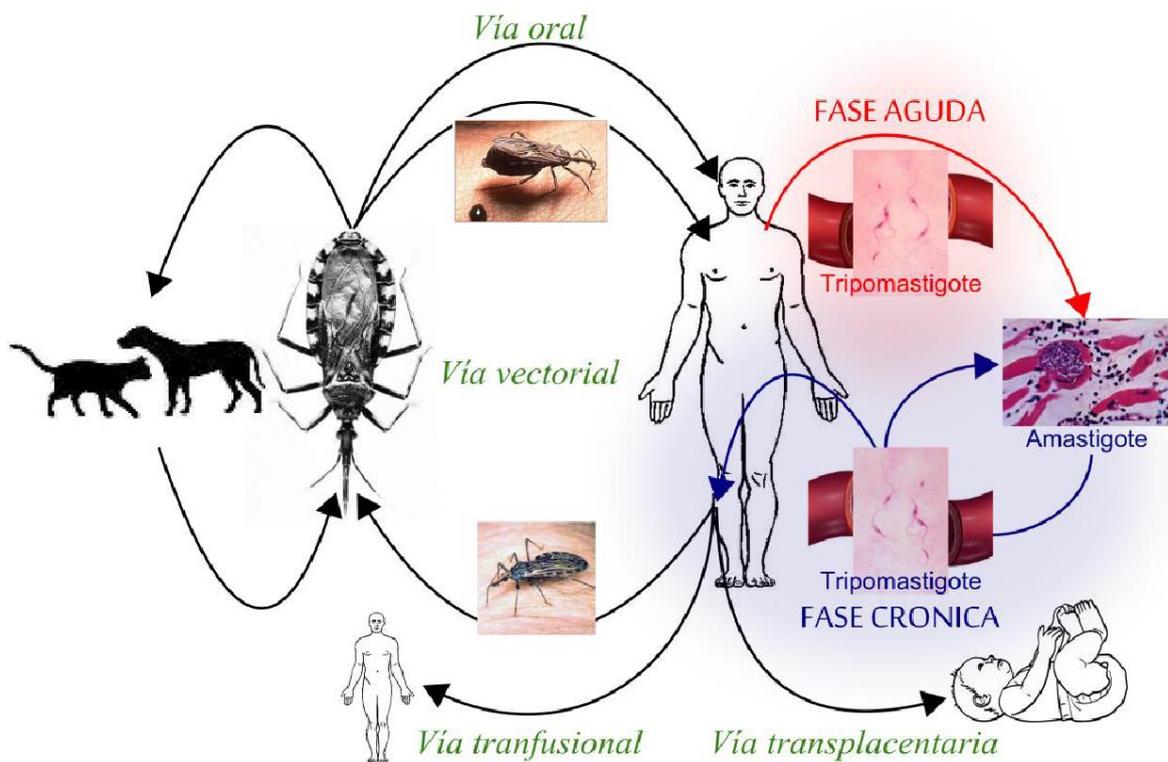
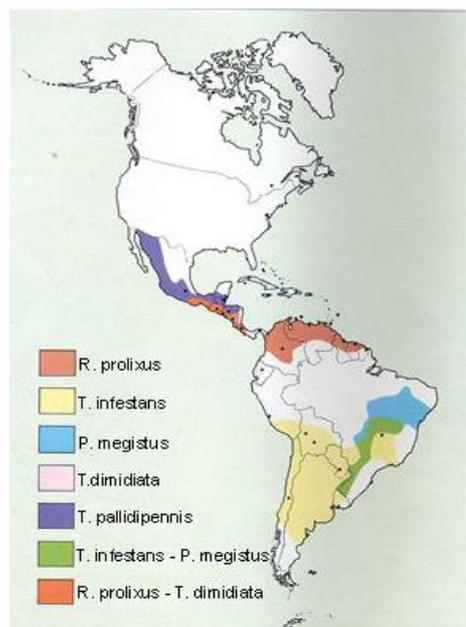


Figura 3. Ciclo de vida del *T. cruzi* y formas de transmisión.

#### **1.4 Vector del *Trypanosoma cruzi***

Los triatomínos que transmiten el *T. cruzi* habitan en focos naturales, donde se alimentan con sangre de animales silvestres. Con el avance de la civilización hacia las zonas selváticas, numerosas especies de insectos se han adaptado a ambientes artificiales creados por el hombre. La migración de ciertos triatomínos desde los focos selváticos hacia las zonas urbanizadas puede ser activa (por ej., el *P. geniculatus* es atraído por la luz artificial), o pasiva (el *R. prolixus* es frecuentemente transportado en hojas de palma utilizadas para construir las viviendas, por la ropa y utensilios) (Maekelt, 1983). Algunas de las especies de triatomínos han ganado acceso a viviendas humanas o de animales creadas por el hombre. Dentro de las viviendas de construcción precarias, los insectos hacen sus nichos en las paredes y techos manteniéndose fuera del alcance de la vista del hombre durante las horas de luz, lo cual hace dificultosa su visualización.

Se ha detectado la presencia de *T. cruzi* en numerosas especies de triatomínos estudiados (Gourbière S. y col, 2012). Tal como se muestra en la figura 4 las especies domésticas más importantes en la epidemiología de la tripanosomiasis americana son el *Triatoma infestans* (Cono Sur), *T. dimidata* (norte de Sudamérica y países centroamericanos), *Rhodnius prolixus* (Brasil, Colombia y Venezuela) y *Pastrongylus megistus* (Brasil).

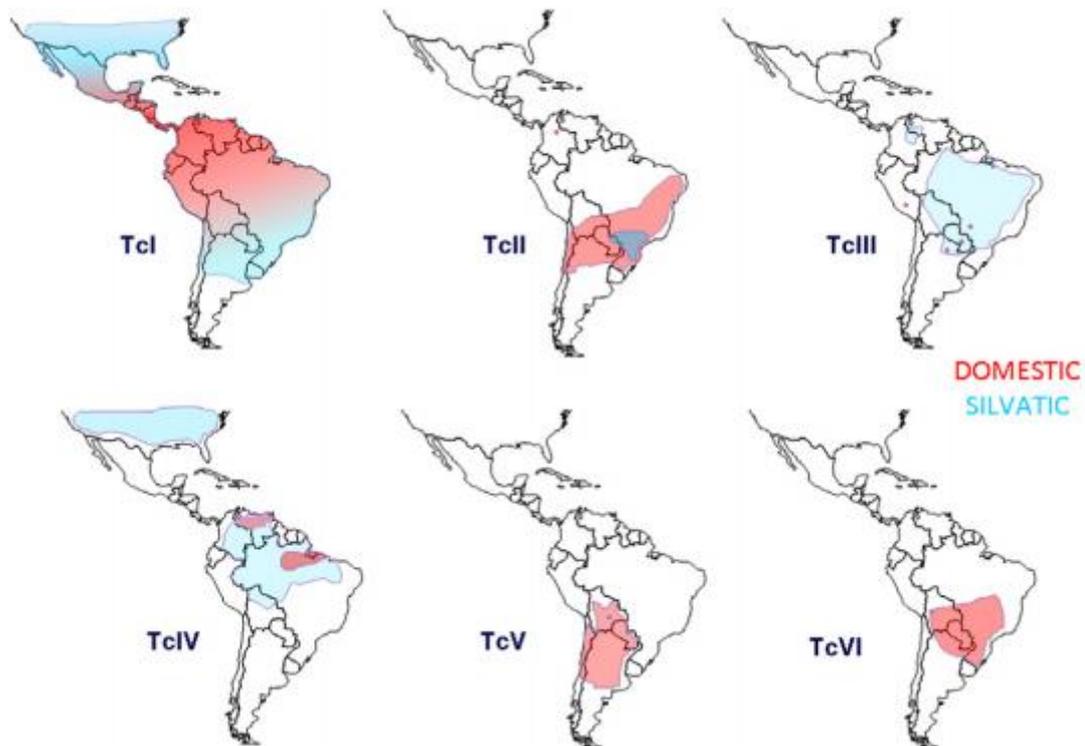


**Figura 4. Distribución del vector en las Américas**

### 1.5 Linajes del *T. cruzi*

El *T. cruzi* posee una diversidad en su genoma y multiplicidad en su genotipos y fenotipos. A diferencia de otros tripanosomas, el *T. cruzi* no presenta mecanismos de variación antigénica pero sí presenta diferencias bioquímicas y moleculares entre distintas cepas del parásito. Brisse y col, 2000 agruparon las cepas en 6 linajes denominados “unidades discretas de tipificación” (UDT). En el año 2009, estas UDTs fueron renombradas por consenso como TcI-TcVI (Zingales 2009). El término UDT (“discrete typing units”) fue propuesto para describir y agrupar aislamientos parasitarios mucho más similares genéticamente entre sí que otros y que son identificables por marcadores enzimáticos y moleculares comunes (“tags”). Estas UDTs están distribuidas de manera diferencial en la naturaleza y todas ellas fueron descritas en humanos (Breniere y col., 2016). Como se puede observar en la figura 5, la más abundante es la TcI y está ampliamente distribuida por todo el continente

americano y está asociada tanto al ciclo selvático como doméstico (Zingales, 2012). Esta UDT se asocia con la cardiomiopatía chagásica. La TcIII se asocia mayoritariamente con el ciclo selvático en Brasil y países vecinos, siendo rara la infección en humanos. TcIV se distribuye de manera similar a TcIII salvo que está ausente en Chaco, Argentina. TcII se encuentra en el sur y centro de América del Sur y está asociada con el desarrollo de megacolon, megaesófago y cardiomiopatía chagásica y raramente asociado a un ciclo selvático. TcV y TcVI se encuentran en el sur y centro de América del Sur, están asociados a ciclos domésticos y desarrollo de megasíndromes y miocardiopatía. Actualmente se considera que los diferentes linajes de *T. cruzi* influyen tanto en la magnitud de la infección, el diagnóstico y el efecto del tratamiento de las personas infectadas pudiendo haber fracaso del mismo.



**Figura 5. Distribución geográfica de las UDT. Ciclos selváticos y domésticos. Fuente: tomado de Zingales 2012**

### **1.6 Fases de la Infección por *Trypanosoma cruzi***

La infección por *T. cruzi* comprende en dos fases: aguda y crónica, cada una con características clínicas propias y criterios diagnósticos y terapéuticos diferentes. La fase aguda se caracteriza por la presencia de parásitos en sangre en cantidad suficiente que permite su detección por métodos parasitológicos directos. Esta fase se inicia en el momento de adquirir la infección por cualquiera de las vías de transmisión. La duración y la presentación clínica de la misma es variable, dependiendo de la edad del paciente, del estado inmunológico, la presencia de comorbilidades y la vía de transmisión. En cuanto a la presentación clínica, la misma puede ser

sintomática, oligosintomática o asintomática, siendo esta última la forma clínica más frecuente. Por tal motivo es indispensable mantener una actitud alerta y considerar la enfermedad de Chagas en todo individuo con antecedentes epidemiológicos (permanencia en área rural endémica, haber recibido transfusiones o nacido de una madre infectada). Si bien la infección adquirida por transmisión vectorial puede presentarse a cualquier edad, el mayor riesgo se encuentra en los niños menores de diez años. La fase aguda de la infección adquirida por ésta vía puede durar entre 2 y 4 meses, y cursa en la mayoría de los casos en forma asintomática. Las manifestaciones clínicas específicas se presentan en sólo el 5% de los casos agudos entre las cuales se incluyen: Chagoma de inoculación, Complejo oftalmoganglionar (signo de Romaña), Chagoma hematógeno y el Lipochagoma geniano. La infección aguda por vía vectorial constituye una verdadera urgencia epidemiológica, dado que es un marcador de la presencia del vector y de transmisión activa en la región, por lo que se requiere la implementación de medidas de evaluación y control entomológico en el área donde se produjo. Se estima que la vía congénita de infección es actualmente la vía más frecuente en la generación de nuevos casos tanto en áreas endémicas como no endémicas. Debido a que la infección de la madre es un elemento indispensable en la génesis de un caso congénito, las medidas de control clínico deben comenzar antes del nacimiento del bebé, mediante la evaluación de toda mujer embarazada. De acuerdo a la ley nacional Nro. 26.281/07, toda mujer embarazada debe ser estudiada para confirmar o descartar la infección por *T. cruzi* a través de una muestra de sangre. Idealmente, dicho estudio debería solicitarse en su primer control prenatal. El diagnóstico de

infección crónica por *T. cruzi* en toda mujer en edad fértil obliga al estudio y evaluación de toda su descendencia. De acuerdo a la ley nacional de pesquisa neonatal Nro 26.279 del año 2007, todos los recién nacidos vivos hijos de madres infectadas deben ser estudiados luego del nacimiento para descartar una eventual infección congénita por *T. cruzi*. Además, la ley Nro 26.281/07 hace obligatorio el seguimiento y estudio de todo niño de madre con infección crónica por *T. cruzi* hasta el año de vida. En cuanto a las manifestaciones clínicas, la mayoría de los niños con infección congénita son asintomáticos.

Los signos y síntomas clínicos de la fase aguda generalmente remiten ya sea como resultado del tratamiento específico o espontáneamente. En los casos de infección aguda no tratados, los individuos entran en un estadio crónico asintomático. La parasitemia se vuelve indetectable por los métodos parasitológicos directos y la infección puede ser diagnosticada principalmente por tests serológicos (que demuestran la respuesta inmunológica del huésped frente al parásito) y también por métodos parasitológicos indirectos (xenodiagnóstico, hemocultivo y técnicas moleculares). . Aproximadamente el 30% de las personas con infección crónica desarrollarán lesiones a nivel cardíaco y/o digestivo en la tercera década de la vida, con signos y síntomas de expresión variada. De acuerdo a ello, la fase crónica se clasifica en dos formas clínicas:

1) sin patología demostrada (anteriormente llamada forma indeterminada) que se caracteriza por la presencia de serología reactiva para *T. cruzi* y ausencia de lesión orgánica compatible con patología cardíaca o digestiva de origen

chagásico que sea clínicamente evidente o detectable por estudios complementarios y

2) con patología demostrada que se caracteriza por presentar alguna manifestación orgánica compatible, ya sea cardíaca, digestiva o hallazgos patológicos en estudios complementarios. (WHO, 2012; Guías de atención al paciente infectado con *Trypanosoma cruzi*, Ministerio de Salud de la Nación, 2012)

### **1.7 Diagnóstico de la Infección por *Trypanosoma cruzi***

El diagnóstico de infección por *T. cruzi* se realiza por métodos parasitológicos, métodos serológicos y técnicas moleculares

#### **1.7.1 Métodos parasitológicos**

Los métodos parasitológicos implican la visualización del parásito en sangre periférica del paciente y tienen relevancia para el diagnóstico de infección por *T. cruzi* en fase aguda. Durante la fase crónica, la baja parasitemia hace que los métodos parasitológicos convencionales posean baja sensibilidad y, por lo tanto, sean de bajo valor diagnóstico en el manejo clínico de los pacientes. Los métodos recomendados para esta etapa, indicándose en orden creciente de complejidad y sensibilidad son los siguientes:

- **Métodos de concentración** parasitaria que comprenden el **Micrométodo INP; Método de Capilares y Strout**. La validación analítica de estos métodos arrojó una sensibilidad del 95% (De Rissio A.M., Riarte A.R. y col, 2010; Freilij H. y col, 1983) en fase aguda. La

sensibilidad encontrada en Laboratorios de Referencia es del 50% y en laboratorios de centros de salud llega hasta el 25% (Sosa Estani S. y col, 2008) en fase aguda.

- **Métodos parasitológicos de amplificación: Hemocultivo y Xenodiagnóstico.** El Hemocultivo consiste en estimular la multiplicación *in vitro* de los parásitos en diferentes muestras del paciente. Posee una alta sensibilidad en la fase aguda (mayor al 95%) en fase aguda (Abramo Orrego L. y col, 1980) . Y baja en fase crónica que puede llegar hasta el 50%, según diferentes trabajos realizados (Chiari E. y col, 1989; Portela-Lindoso AA y Shikanai-Yasuda MA., 2003). El Xenodiagnóstico consiste en en amplificar la población parasitaria a través de la alimentación de triatomíneos de laboratorio no infectados con sangre del paciente en estudio y evaluación de las heces 4 a 6 semanas después para detección de parásitos. En la actualidad, este método es utilizado con fines de investigación como por ejemplo, en la caracterización de cepas y ensayos clínicos que evalúan efecto terapéutico.

### **1.7.2 Métodos serológicos**

Los métodos serológicos detectan anticuerpos específicos anti-*T.cruzi* en sangre periférica. Entre los 15/30 días de instalada la primo-infección, los anticuerpos específicos comienzan a aumentar en la circulación alcanzando su máximo nivel al tercer mes. Por lo tanto, la serología tendrá valor diagnóstico

en fase aguda cuando se confirme la seroconversión por seguimiento de la persona bajo sospecha de infección en el tiempo. Estos métodos son los de elección para realizar el diagnóstico de la infección en la fase crónica. Según recomendación de la Organización Mundial de La Salud (OMS, 2002) se deben utilizar dos técnicas que posean antígenos diferentes en su reacción. En Argentina, la combinación de inmunoensayos que se utilice en el diagnóstico de enfermedad de Chagas deben poseer además distintos principios de interacción (Normas de Diagnóstico, INP Argentina revisión 2012) que permitan alcanzar un rango de sensibilidad entre 98 y 99.5% (Alvarez M. y col., 1968; Cerisola J.A. y col, 1969; Cerisola J.A. y col, 1971 Cura EN y col, 1993; Organización Mundial de la Salud, 2012; Afonso A.M. y col, 2012).

En la actualidad existen ensayos inmunoserológicos convencionales, que utilizan como antígeno el lisado de una fracción del parásito como el enzimoimmunoensayo, (ELISA), la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), la Hemaglutinación Indirecta (HAI) y la aglutinación de Partículas (APG). Con el advenimiento de la tecnología proteómica y genómica se lograron sintetizar antígenos recombinantes purificados y utilizarlos en una mezcla con el fin de mejorar la precisión/exactitud del serodiagnóstico. Estos antígenos son empleados en los inmunoensayos no convencionales como en las ELISAs recombinantes, Western blot y en una nueva generación de ensayos que incorporan sistemas de detección más sensibles como es la quimioluminiscencia (CMIA) (Abras y col. 2016). Estos últimos deben reunir varios criterios para su utilización en un test diagnóstico, a saber: deben estar presentes en *T. cruzi* aislados de diferentes áreas endémicas, estar presentes

en los linajes más frecuentes, ser altamente inmunogénicos en la población con diferente base genética independientemente de la fase clínica de enfermedad de Chagas, ser estables y garantizar reproducibilidad (OMS, 2002; Gomes y col, 2009).

Las duplas serológicas empleadas en la rutina de laboratorio que garantizan el rango de sensibilidad (99%) recomendadas por las Normas de Diagnóstico (revisión 2012) en Argentina son: **HAI – IFI, HAI – ELISA, ELISA – IFI y ELISA – APG.**

El Western blot es utilizado como test diagnóstico complementario para confirmar la infección debido a su alto costo y la complejidad para su realización (Coura y col, 2012).

El CMIA es un test automatizado que además de poseer una mayor sensibilidad permite procesar un gran número de muestras en corto tiempo (Abrás y col, 2016). En Argentina solo es utilizado en laboratorios de alta complejidad y en Bancos de Sangre. Las normas de Diagnóstico elaboradas por INP indican la necesidad de combinar este test con otra técnica que posea un principio diferente como la HAI e IFI.

### **1.7.3 Métodos Moleculares**

Los métodos moleculares para determinar el status de infección comprenden la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR por su acrónimo en inglés Polymerase Chain Reaction) cualitativa o cuantitativa. Esta es una técnica estandarizada, aunque todavía se encuentra en proceso de validación clínica.

Actualmente se cuentan con equipos “in house” estandarizados y validados en centros de referencia (Schijman y col 2011; Duffy y col 2013). Es posible utilizarla tanto en la fase aguda como la fase crónica de la infección. Hasta la fecha su uso ha demostrado utilidad en: diagnóstico perinatal de la infección congénita en su fase aguda, monitoreo del tratamiento antiparasitario para diagnosticar fracaso terapéutico y en el monitoreo y diagnóstico de reactivación en pacientes inmunosuprimidos (SIDA, trasplantes, otros). Los resultados de la PCR se obtienen en menor tiempo y son más sensibles que los otros métodos parasitológicos convencionales.

#### **1.7.4 Interpretación del Diagnóstico de laboratorio.**

##### **1.7.4.1 Diagnóstico serológico de infección por *Trypanosoma cruzi***

En la actualidad el diagnóstico de la infección se realiza utilizando una dupla serológica que debería ser realizada de manera simultánea en la misma muestra de sangre obtenida del paciente (Organización Mundial de la Salud, 2002).

El resultado positivo del diagnóstico parasitológico y molecular es la confirmación de infección por *T. cruzi*. Sin embargo, un resultado negativo no indica necesariamente ausencia de la infección debido a que la parasitemia puede ser intermitente y los métodos parasitológicos poseen baja sensibilidad en la fase crónica de la infección.

Los métodos moleculares poseen la misma sensibilidad que la serología en la fase crónica por lo que no es necesario su uso para el diagnóstico de infección en pacientes inmunocompetentes.

El resultado serológico reactivo es indicativo de infección y no del estado clínico del paciente. El mismo servirá de orientación al médico junto con el examen clínico y los antecedentes para conocer el estado de salud del paciente.

Los resultados de reactividad serológica son expresados como títulos en el caso de IFI y HAI, y DO en el caso de ELISA. Si bien hasta ahora los valores obtenidos de los ensayos inmunoserológicos no han mostrado tener correlación con el compromiso orgánico de enfermedad de Chagas, se recomienda informarlos junto al resultado reactivo. Estos datos tienen significación diagnóstica en los casos de seguimiento del niño hijo de madre reactiva, en casos de pacientes con tratamiento específico y de los pacientes inmunosuprimidos

**En el caso de encontrar resultados “No concordantes”** entre las dos pruebas serológicas empleadas, se recomienda repetir nuevamente ambos ensayos (OMS, 2012), para descartar errores operativos, efectuar una tercera reacción serológica o remitir la muestra a un laboratorio de mayor complejidad (laboratorio de Referencia Provincial o Nacional) para su resolución. En caso de persistir la discordancia de resultados es recomendable analizar una nueva muestra en un lapso de 20 a 30 días (Normas de Diagnóstico de la Infección por *T. cruzi*, Ministerio de Salud, revisión Octubre 2012; OMS 2002)

#### **1.7.4.2 Tamizaje**

Con el fin de identificar rápidamente la infección por *T. cruzi* en grandes poblaciones, como por ejemplo donantes de sangre a transfundir o bien en

estudios poblacionales, se requiere el uso de técnicas inmunoserológicas rápidas y sensibles.

#### **1.7.4.2.1 Tamizaje en Bancos de Sangre**

Todos los donantes de sangre deberían ser estudiados serológicamente para infección por *T. cruzi*. Para ello se utilizan 2 reacciones serológicas de selección o descarte (RSD), como por ejemplo CMIA, ELISA recombinante, etc o bien los métodos serológicos convencionales. Según reporte técnico de OMS (Recommendations Screening Donated Blood for Transfusion-Transmissible Infections, 2009) y Normas Técnicas de Hemoterapia (Resolución Ministerial N° 865/06), el uso de dos técnicas de ELISA (de antígeno lisado u homogenato total y de antígenos recombinantes) es recomendable. Los bancos de sangre necesitan disponer de pruebas de alta sensibilidad que puedan ser automatizadas. Cuando se obtienen resultados reactivos por 1 o 2 métodos de descarte, se debe desechar la bolsa de sangre. El laboratorio que realice la selección o descarte de las muestras reactivas **debe derivar al donante encontrado reactivo, a un laboratorio especializado que pueda confirmar el diagnóstico de infección.**

#### **1.7.4.2.2 Tamizaje poblacional**

Esta metodología se utiliza cuando se quiere detectar rápidamente los casos de infección en una gran población de personas. En la actualidad este estudio se lleva a cabo mediante la obtención de sangre del pulpejo del dedo en papel de filtro y su posterior análisis con las pruebas inmunoserológicas convencionales. Si una o dos pruebas dan reactivas se procede a la extracción

por punción venosa y su confirmación serológica como se indica en el caso de Diagnóstico de la infección Crónica (Chuit R. y col, 1989; Alvarez M. y col, 1971; Briceño D. y col, 2012).

En Argentina se utiliza un equipo de recolección y conservación de antígenos y anticuerpos para la enfermedad de Chagas en sangre entera, (SEROKIT; Yanovsky J., 1994) que consiste en extraer sangre del pulpejo del dedo y colocar mediante un capilar la sangre en un vial que contiene un conservante de muestra que permite su almacenamiento por un tiempo prolongado. Luego de la obtención se procede a realizar el análisis mediante dos pruebas serológicas convencionales definidas. Si una o dos pruebas dan reactivas se debe confirmar el diagnóstico tal como se indica en el párrafo anterior.

Otra manera de llevar a cabo este estudio es mediante el uso de pruebas inmunocromatográficas (Test Rápidos). Estas pruebas se realizan con sangre que se obtiene por la punción del pulpejo del dedo (sangre capilar) en campo o bien con sangre entera o plasma. La ventaja de este sistema es que el resultado se obtiene como máximo en 15 minutos, y si la prueba resulta reactiva se procede a extraer sangre venosa para su confirmación diagnóstica por pruebas inmunoserológicas convencionales. Esto permite lograr una mayor cobertura en estudios epidemiológicos dada la simplicidad del muestreo y obtener evaluaciones de impacto de acciones de control vectorial y sanitario con menor cantidad de recursos e insumos. (Luquetti A.O. y col, 2003; Ponce C., Ponce E. y col, 2005; Sosa Estani S. y col, 2008; Roddy P. y col, 2008; Chippaux J.P. y col., 2009; Verani J. R. y col, 2009; Chappuis F. y col., 2010)

## 2. Antecedentes del estudio

El diagnóstico de enfermedad de Chagas requiere de pruebas que posean principios y antígenos diferentes con el fin de lograr una sensibilidad del 99,9% para poder confirmar la infección (Organización Mundial de la Salud, 2002; Normas de Diagnóstico de la Infección por *T. cruzi*, Ministerio de Salud, Argentina, revisión Octubre 2012). En el mercado se encuentran disponibles numerosos inmunoensayos (ELISA, HAI, IFI, CMIA) y son usados comúnmente en laboratorios con personal entrenado y equipamiento adecuado. Sin embargo, estas pruebas son inapropiadas para su uso en áreas endémicas donde no existen estas condiciones además de que estos reactivos requieren refrigeración para su óptima conservación. Existe una necesidad de contar con una herramienta que facilite realizar estudios poblacionales en áreas que son remotas y de difícil acceso con el objetivo de implementar estrategias que permitan realizar el control y la prevención de la enfermedad. Los test rápidos ofrecen una opción importante para el análisis en lugares de limitados recursos: son precisos, no requieren mantenerse en condiciones de refrigeración, proporcionan resultados rápidos, son fáciles de usar e interpretar, y pueden potencialmente ser fabricados a bajo costo. En años recientes se han desarrollado varios test rápidos para detectar infección por *T. cruzi* usando muestras de sangre entera, suero o plasma, que se encuentran disponibles en el mercado. Entre ellos el test Chagas Stat-Pak de la empresa Chembio ha sido evaluado en su rendimiento en diferentes áreas endémicas de Latinoamérica mostrando resultados de sensibilidad del 85% al 100% y especificidad del 97% al 100% dependiendo del área geográfica. (Luquetti A.O. y col, 2003; Ponce C.,

Ponce E. y col, 2005; Sosa Estani S. y col, 2008; Roddy P. y col, 2008). En el marco de la 63rd Asamblea Mundial de la Salud se delineó la necesidad de promover y estimular la investigación operacional sobre el control de enfermedad de Chagas (resolución WHA 63.20). En esta reunión se recomendó la utilización de sistemas que permitan la rápida detección y que permitan integrar el nivel primario de salud, el diagnóstico y tratamiento en pacientes tanto en fase aguda como crónica de la infección en países endémicos y no endémicos (22 y 23 Reunión internacional MSF, 2008; WHO, 2010). Con financiamiento del Portafolio de Innovación en Salud de la Fundación Bill & Melinda Gates, la Organización Internacional sin fines de lucro PATH, con sede en Seattle, Washington, USA, dedicada a acrecentar la innovación a través de cinco plataformas -vacunas, medicamentos, diagnósticos, dispositivos e innovaciones de sistemas y servicios ha desarrollado una prueba rápida para tamizaje que podría ser utilizada en estudios poblacionales o en centros primarios de salud. Para esta prueba, se utilizó un antígeno recombinante de *T. cruzi* desarrollado por el Laboratorio Lemos con un relativamente bajo costo de producción (Barfield C.A. y col, 2011). Es posible que este antígeno pueda mejorar el rendimiento de la prueba para el tamizaje en comparación con otras pruebas rápidas actualmente disponibles, debido a la inclusión de epítopes *T. cruzi* únicos.

### 3. Objetivo del estudio

El objetivo general de este trabajo es establecer el rendimiento de la prueba inmunocromatográfica ICT Chagas para el tamizaje de la infección por *T. cruzi* en un centro de referencia para la enfermedad de Chagas. Esta investigación brindará información importante para el desarrollo de herramientas epidemiológicas orientadas a determinar exposición al parásito en áreas de difícil acceso.

Los objetivos específicos son:

1. Determinar los parámetros de rendimiento de la prueba inmunocromatográfica en diferentes matrices.
2. Establecer el tiempo óptimo de incubación de la prueba.
3. Evaluar el rendimiento de la prueba en función del área geográfica de riesgo de transmisión de la infección por *T. cruzi*.
4. Comparar el rendimiento de la prueba ICT Chagas con otra prueba inmunocromatográfica comercial disponible en el mercado nacional.

## 4. Materiales y Métodos

### 4.1 Diseño experimental y Población de estudio

El presente estudio fue llevado a cabo en el Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatała Chabén” (INP) Buenos Aires, Argentina, durante el período Septiembre 2012 - Marzo 2013. El INP es el Centro Nacional de Referencia para la enfermedad de Chagas y tiene como función promover, coordinar y realizar actividades de investigación epidemiológica, clínica, inmunológica y bioquímica, así como también brindar servicios referenciales (atención diagnóstica y tratamiento) al Sistema de Salud de Argentina y a la comunidad.

Para la construcción del algoritmo de reclutamiento de las personas a participar del estudio y aplicación de los distintos ensayos se utilizó STARD 2015 (Bossuyt P.M y col., 2003).

Para el reclutamiento, se solicitó diariamente por un período de 7 meses la participación de los primeros diez individuos que concurren a realizarse el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* en el INP. A todos los individuos se les explicó la utilidad de la investigación y se solicitó su participación mediante donación de sangre; en caso afirmativo se procedió a tomarles el consentimiento informado y fueron seleccionados según los criterios de inclusión o exclusión descriptos en el siguiente punto. Del total de la población que se presentó se enrolaron 846 individuos mayores de 7 años de edad que se presentaron espontáneamente para realizar el diagnóstico confirmatorio de enfermedad de Chagas.

## 4.2 Criterios de Inclusión y exclusión

### Criterios de inclusión:

- Hombres o mujeres de 7 años o más. La selección del grupo etario se debe a que el grupo de 0 a 6 años estaba involucrado en otro estudio clínico.

Consentimiento informado escrito (CI) firmado, obtenido antes de efectuar cualquier procedimiento. Como requisito, los pacientes debían comprender el documento, y su aceptación de participar quedó registrada mediante firma del mismo. En caso de los menores de edad el CI debía ser firmado por un adulto o tutor responsable del niño si aceptaba libremente participar del estudio asintiendo con un SI verbal.

### Criterios de exclusión:

- Haber recibido tratamiento previo con benznidazol o nifurtimox (ya sea de forma completa o incompleta) o haber participado en ensayos clínicos de tratamientos activos para la enfermedad de Chagas.
- Si se había extraído sangre dentro de los 56 días en una cantidad mayor a 50 ml o 3 ml por Kg de peso.
- Si tenía relación cercana con el personal del centro de investigación; por ej, familiar cercano del investigador, dependiente (ej: empleado o estudiante del centro de investigación que podría tener acceso a los registros del estudio).

Luego de la inclusión y la toma de consentimiento informado, se realizó un

cuestionario que permitió recolectar datos demográficos y filiatorios de todos los participantes que luego fueron registrados en una base de datos (File Maker Pro. 10.0).

### **4.3 Aprobación ética y Consentimiento Informado**

El protocolo del estudio fue aprobado por la Junta de Revisión del Comité de Bioética del INP según normas nacionales previstas para requisitos éticos, legales y jurídicos, establecidos en la Resolución Ministerial 1480/11 e internacionales acorde a criterios éticos de la Declaración de Helsinki 2008 y sus modificaciones, código de Nüremberg y Derechos Humanos aprobada por la Conferencia General de la UNESCO 1997.

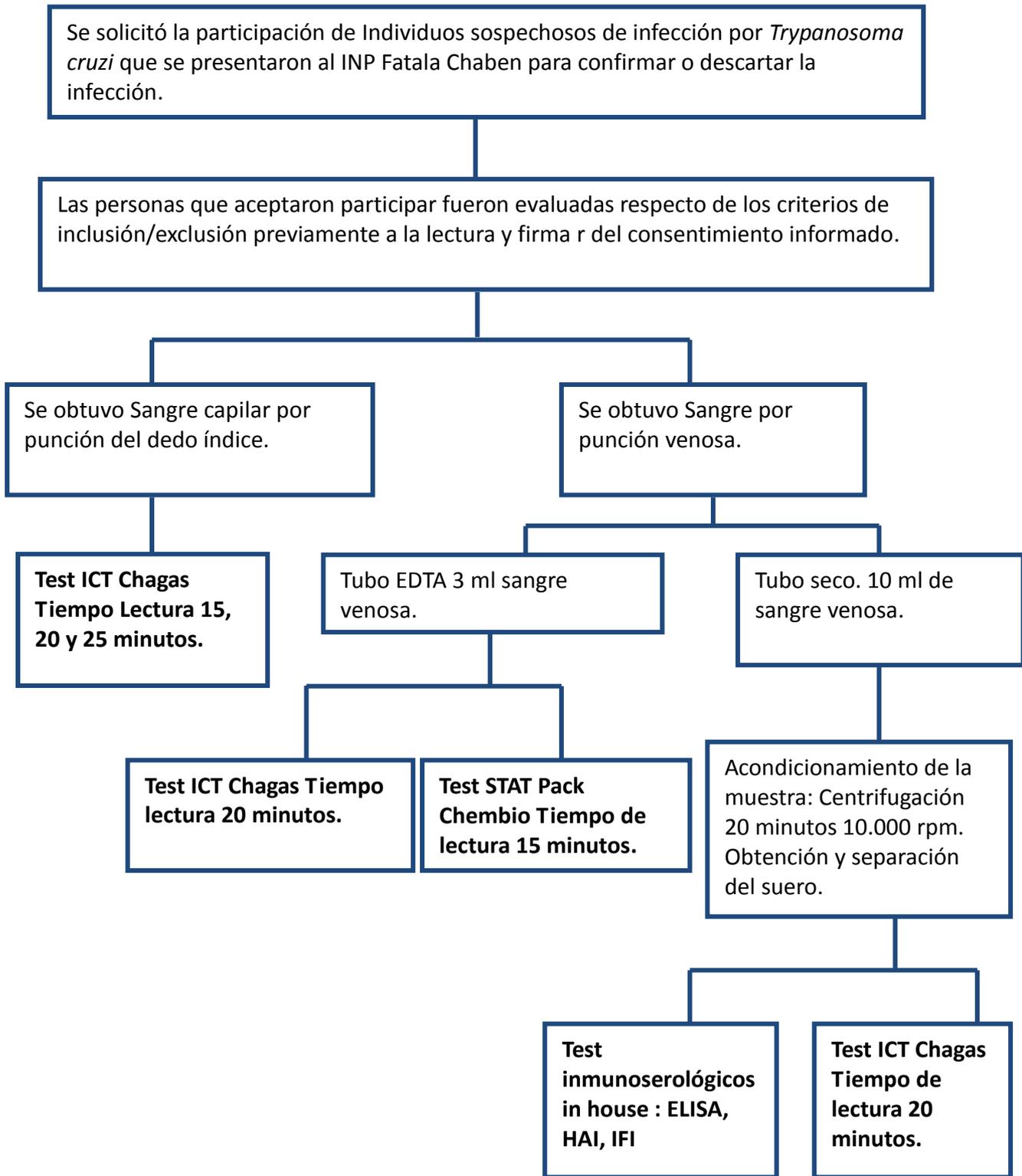
### **4.4 Diagrama del estudio**

Una vez que los participantes eran enrolados se procedió a coleccionar las muestras siguiendo los procedimientos estándares y las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL). Se obtuvieron 30 microlitros de sangre capilar mediante punción del dedo índice o medio usando una lanceta y un tubo capilar que contiene EDTA (SafeWrap™ Blood Collection Tubes, RNA Medical) e inmediatamente se realizó la prueba ICT Chagas como se muestra en el diagrama. . De la vena del antebrazo se coleccionó un total de 15 ml de sangre venosa la cual se distribuyó de la siguiente manera: 3ml en un tubo que contenía EDTA como anticoagulante y 10 ml en un tubo seco sin anticoagulante. El tubo que contenía sangre entera (EDTA) fue mezclado, alícuotado y testeado dentro de las 2 a 3 horas de coleccionada la muestra utilizando la prueba ICT Chagas y la prueba Chagas Stat-Pak de Chembio,

siguiendo las instrucciones del fabricante. El tubo conteniendo la sangre sin anticoagulante fue centrifugado 20 minutos a 3000 rpm; el suero obtenido se separó y almacenó a 2-4°C hasta su procesamiento dentro de las 24 hs. Una alícuota se utilizó para realizar la prueba ICT Chagas y otra alícuota se utilizó para realizar las pruebas serológicas in house del INP, ELISA, HAI e IFI.

Todos los ensayos fueron realizados por diferentes operadores a fin de mantener el ciego y evitar posibles sesgos en los resultados quienes volcaron los datos a una planilla individual. Luego, éstas eran recolectadas por un personal administrativo, quien estaba encargado de volcar esos resultados en una planilla Excel. El esquema de recolección y procesamiento de las muestras se muestra en el siguiente diagrama 1.

### Diagrama 1. Diagrama de flujo del estudio



## 4.5 Tests empleados en el estudio

### 4.5.1 Test ICT Chagas

El Test ICT Chagas es una prueba inmunocromatográfica que detecta anticuerpos anti-*T. cruzi* en sangre, suero o plasma. Tal como se observa en la figura 6ª, el test está compuesto por un cassette plástico, una almohadilla absorbente, una membrana de nitrocelulosa que posee una zona o línea denominada CONTROL (0,12 microgramos de anticuerpo de cabra anti IgG de ratón, Jackson Immunologicals) y una zona o línea denominada TEST (0,32 microgramos de antígeno recombinante de *T. cruzi*, Laboratorio Lemos) y una almohadilla que contiene el reactivo detector o conjugado unidos a partículas secas de oro coloidal

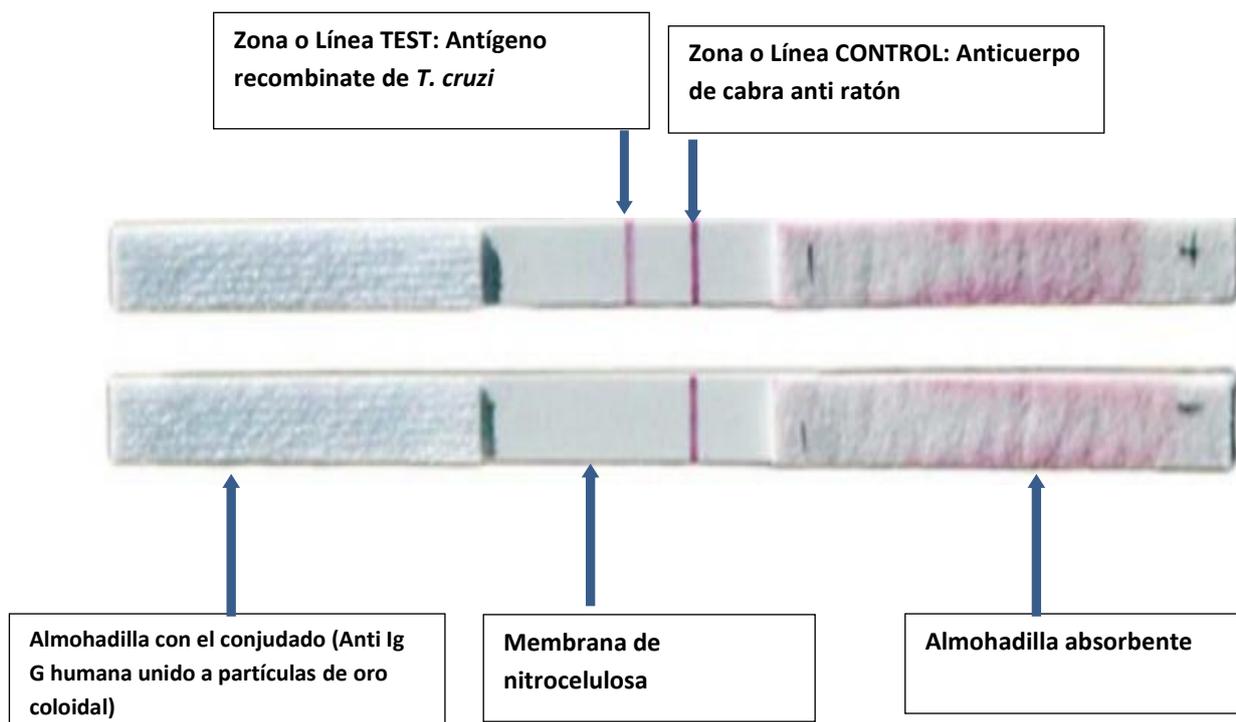


Figura 6. A



**Figura 6.B**

**Figura. 6 Diseño Test Rápidos ICT Chagas, A. Componentes del test; B. Test positivo (dos líneas, derecha) y test negativo (una línea, izquierda)**

Los test fueron realizados de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se agregaron 30 microlitros de sangre capilar, sangre venosa o suero al pocillo del dispositivo denominado MUESTRA, se incubó 2 minutos y luego se adicionó 125 microlitros de buffer de corrida en el mismo pocillo. La muestra y el buffer de corrida se mezclan ascendiendo por capilaridad a través de la membrana de nitrocelulosa y rehidrata el reactivo que se encuentran en el área donde se halla el conjugado o reactivo detector. Este reactivo se une a las inmunoglobulinas humanas de la muestra. Si la muestra contiene anticuerpos anti-*T. cruzi*, el complejo conjugado- anticuerpo anti-*T. cruzi* se unirá al antígeno en la línea o zona denominada TEST, produciendo una línea de color rosado. En ausencia de anticuerpos anti- *T. cruzi* la línea rosada en esta zona no se producirá.

La lectura de los test se interpreta como resultados positivo, negativo o inválido. Los mismos fueron considerados positivos si la línea rosada se observa en ambas zonas CONTROL y TEST y negativos si la línea rosada solo se observa en la zona denominada CONTROL (Figura 6B). Un test inválido se considera si: 1) La línea rosada estaba ausente en la zona denominada CONTROL o 2) Cuando se observó sangre en la ventana de corrida y no podía efectuarse la lectura correctamente.

#### **4.5.2 Chagas STAT-Pak**

El CHAGAS STAT - PAK (Chembio Diagnostic Systems, Medford, NY) es un reactivo diagnóstico inmunocromatográfico de tamizaje para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* en suero, plasma o sangre total. El método emplea una combinación única de proteínas recombinantes fijada a una membrana que retiene los anticuerpos específicos, conjugados con partículas coloreadas. La misma fue considerada positiva si se observó la aparición de una línea púrpura en ambas áreas CONTROL y TEST y negativa si se observó solo la aparición de una línea púrpura en la zona CONTROL. La prueba fue considerada inválida si la línea púrpura estaba ausente en la zona CONTROL.

#### **4.5.3 Realización de los Test**

Para estandarizar el test ICT Chagas y determinar el tiempo de lectura óptimo se ensayó el mismo a diferentes tiempos de lectura (15, 20 y 25 minutos) y matrices (sangre capilar, sangre entera extraída con EDTA y suero).

Para los test corridos con sangre entera y suero, la lectura solo se efectuó a los 20 minutos.

La prueba CHAGAS STAT PACK fue corrida por un técnico de laboratorio del INP diferente a los que procesaron los test ICT Chagas de acuerdo a las instrucciones provistas por el fabricante, utilizando 10 microlitros de sangre entera obtenida con EDTA. La prueba fue leída visualmente e interpretada como positiva, negativa o inválida a los 15 minutos.

Se utilizó como estándar de referencia una combinación de los siguientes ensayos inmunoserológicos in house que se realizan de rutina para confirmar el diagnóstico en el INP (Scott y col, 2008; Bossuyt y col: The STARD Initiative 2003): ELISA (antígeno lisado de epimastigote *T. cruzi* cepa Tul<sub>2</sub>), HAI(antígeno lisado de epimastigotes *T.cruzi* de 29 cepas de referencia) e IFI (antígeno epimastigote *T. cruzi* cepa Tul<sub>2</sub> entero formolado) Los test fueron realizados según los procedimientos operativos estándares (Manual de Laboratorio, octava edición, 1996) del INP. Los valores de corte para las tres técnicas utilizadas son:  $\geq 0,200$  ELISA in house,  $\geq 1/32$  HAI in house,  $\geq 1/32$  IFI in house. Se consideró como caso verdadero negativo (VN) si las tres técnicas (3/3) presentaban resultados NO REACTIVO y como caso verdadero positivo (VP) si las tres técnicas (3/3) o dos de tres (2/3) técnicas presentaban resultado REACTIVO. Se consideró caso discordante si solo una de las tres técnicas daba resultado REACTIVO. Estas muestras fueron repetidas según el procedimiento operativo estándar de manejo de muestra discordante del INP (Normas de Diagnóstico de la Infección por *T. cruzi*, Ministerio de Salud,

revisión Octubre 2012). Las muestras cuyo resultado permaneció discordante fueron eliminadas del análisis.

Con el fin de evaluar el rendimiento de la prueba en función del área geográfica de riesgo de transmisión de la infección por *T. cruzi* se utilizó el mapa de estratificación y caracterización de la transmisión vectorial del Programa Nacional de Chagas, año 2012. De acuerdo a ésta caracterización, se clasificaron las muestras según la procedencia de las personas participantes del estudio en:

1. Área geográfica de RIESGO ALTO de transmisión: Este grupo estaba conformado por las muestras que procedían de Chaco, Catamarca, Formosa, Santiago del Estero, San Juan, Mendoza, Bolivia, Paraguay y Perú. El tamaño muestral correspondiente fue de 347 muestras.
2. Área geográfica de RIESGO MEDIO de transmisión: Este grupo estaba conformado por las muestras que procedían de Córdoba, Corrientes, La Rioja, Salta, y Tucumán. El tamaño muestral correspondiente fue de 172 muestras
3. Área geográfica de RIESGO BAJO de transmisión: Este grupo estaba conformado por las muestras que procedían de Entre Ríos, Misiones, Santa Fé, Jujuy, La Pampa, Neuquén, Río Negro, Brasil, Uruguay y Chile. El tamaño muestral correspondiente fue de 80 muestras.
4. Área geográfica de RIESGO NULO de transmisión: Este grupo estaba conformado por las muestras que procedían de Buenos Aires, Chubut, Santa Cruz, Tierra del Fuego y España. El tamaño muestral correspondiente fue de 154 muestras.

#### **4.6 Aseguramiento de la Calidad**

Antes del comienzo del estudio, de acuerdo como lo indica el protocolo de Control de Calidad del INP, los espectrofotómetros y micropipetas fueron calibrados de acuerdo a los procedimientos estándares recomendados por la empresa de calibración.

Al inicio del estudio se realizó la familiarización de la utilización y lectura de los test rápidos evaluados mediante sueros controles positivos y negativos para todos los operadores. Todos los operadores tenían experiencia previa en la realización de las técnicas Inmunodiagnósticas.

Se participó de un Programa de Control de Calidad Externo analizando a simple ciego un panel de sueros reactivos y no reactivos provistos por Laboratório de Pesquisa em Doença de Chagas, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil, con una frecuencia cuatrimestral. Estos sueros fueron procesados con las tres técnicas "in house" que conformaban el estándar de referencia.

#### **4.7 Análisis estadístico**

El cálculo del N muestral para estimar los parámetros diagnósticos con un IC del 95% de la prueba ICT Chagas se realizó en base a las guías Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) EP24-A2 2011 en base a una prevalencia del 48% del INP. El tamaño de muestra calculado correspondió a un  $n=850$ .

Para la estimación de la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de la prueba ICT Chagas se realizó en base a las recomendaciones de la CLSI EP12 (User

Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline—  
Second Edition EP12-A2 Vol. 28 No. 3 Replaces EP12-A Vol. 22 No. 14) y se  
utilizó StatisPro Method Evaluation Software Versión 3.02.2 del CLSI. El  
cálculo de los IC se realizó a través del “score confidence interval” (Newcombe  
RG, 1998)

Los índices de concordancia Kappa se estimaron de acuerdo a lo recomendado  
por López de Ullibarri Galparsoro, I. y Pita Fernández, S. 1999 y el test de Mac  
nemars de acuerdo a Fistera, 2004.

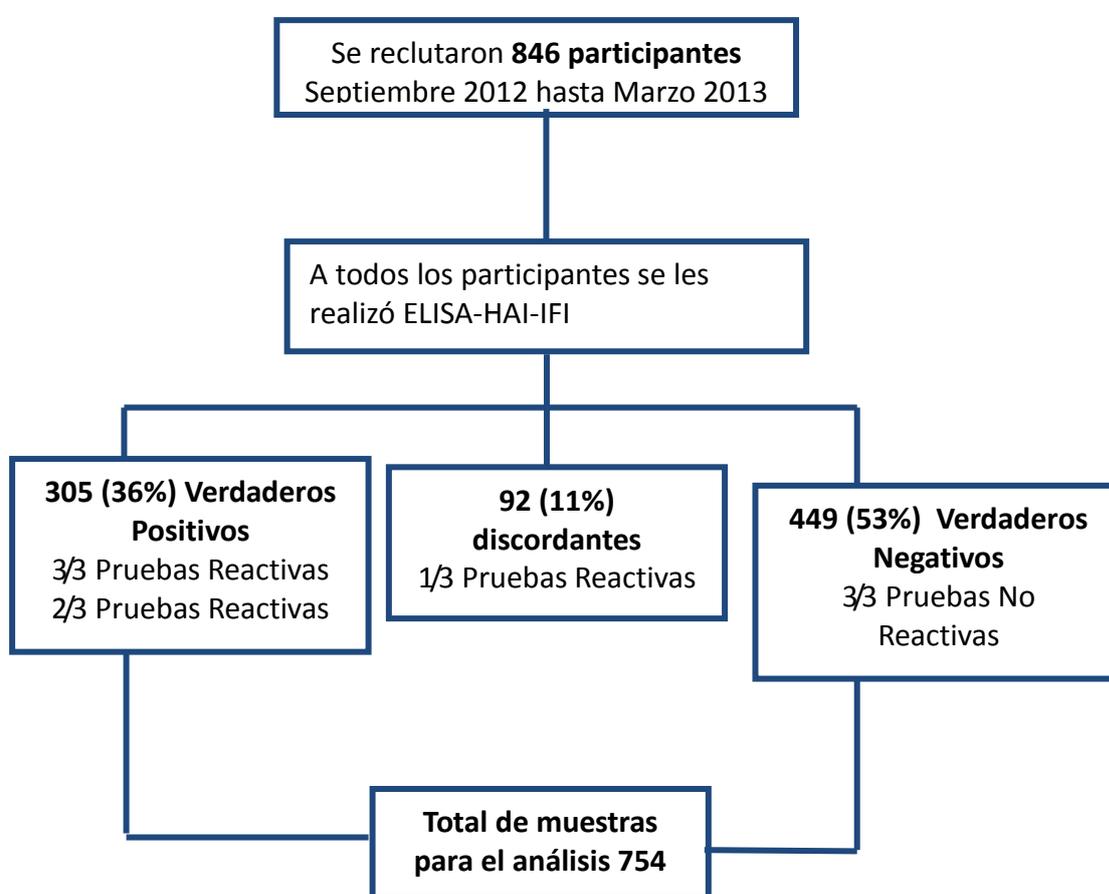
Para la estimación de las razones de verosimilitud positiva (RV+) y negativa  
(RV-) se utilizó: Epi Tools - Diagnostic test evaluation and comparison que  
utiliza como metodología de trabajo según lo recomendado por Brown LD, Cat  
TT, DasGupta A, 200; Cameron AR, and Baldock FC, 1998 y Cameron AR,  
1999.

## 5. Resultados

### 5.1 Selección de la Población de estudio

En el presente trabajo se realizaron a todos los participantes las tres técnicas inmunoserológicas “in house” a los 846 participantes para determinar el estatus positivo o negativo de infección para *T. cruzi* (Estándar de referencia). Los resultados de la serología convencional se presentan resumidos en el diagrama

2



**Diagrama. 2 Total de muestras Verdaderas Positivas, Verdaderas Negativas y Discordantes**

Para la evaluación del rendimiento del test ICT Chagas, se seleccionaron las muestras verdaderas positivas (VP; dos o tres técnicas reactivas) y verdaderas

negativas (VN; tres técnicas no reactivas) excluyéndose las muestras con resultado serológico discordante. La proporción Masculino/Femenino (M/F) fue de 0,80. Los datos de edad y género de la población seleccionada para evaluar el rendimiento del test en estudio se muestra en la tabla II.

**Tabla II. Distribución según edad y género de la población seleccionada para el análisis experimental.**

Edad	VP			VN		
	Femenino	Masculino	Total	Femenino	Masculino	Total
<17	3/15 (20)	1/12 (8)	4/27 (15)	12/15 (80)	11/12 (92)	23/27 (85)
18-30	24/48 (50)	10/31 (32)	34/79 (43)	24/48 (50)	21/31 (68)	45/79 (57)
31-50	74/160 (46)	42/100 (42)	116/260 (45)	86/160 (54)	58/100 (58)	144/260 (55)
51-70	60/179 (34)	73/177 (41)	133/356 (37)	119/179 (66)	104/177 (59)	223/356 (63)
71-90	11/17 (64)	7/15 (47)	18/32 (56)	6/17 (35)	8/15 (53)	14/32 (44)
<b>Total</b>	<b>172/419 (41)</b>	<b>133/335 (40)</b>	<b>305/754 (40)</b>	<b>247/419 (59)</b>	<b>202/335 (60)</b>	<b>449/754 (60)</b>

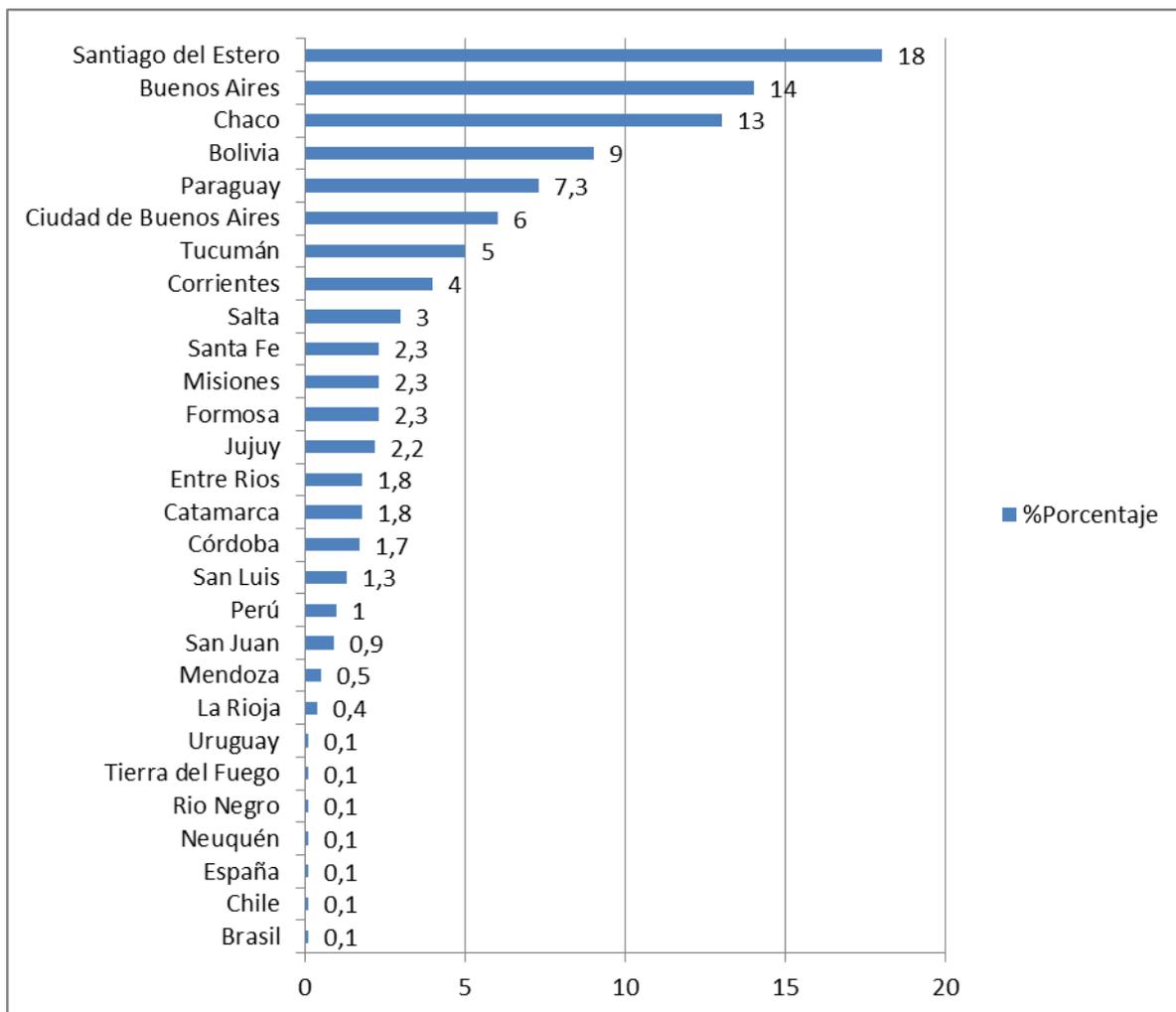
Los datos expresan el número de muestras verdaderas positivas o negativas/ total de muestras analizadas (porcentaje del total) para cada grupo etario y género.

VP, verdaderos positivos

VN, verdaderos negativos

### **5.1.1 Procedencia de la población de estudio**

Como se observa en la Figura 7, el análisis de los datos epidemiológicos mostró que el 81% (610/754) de los participantes eran nativos de Argentina mientras que 9% (70/754) eran inmigrantes de Bolivia, 7.3% (55/754) de Paraguay, 1.0 % (8/754) de Perú y 0,53% (4/754) de otro origen (España, Brasil, Chile y Uruguay). Cuando se analizó el lugar de nacimiento de los participantes de Argentina, 18% (134/754) provenían de la provincia de Santiago del Estero, 14% (105/754) de provincia de Buenos Aires , 13% (100/754) de la provincia de Chaco, 6% (47/754) de la Ciudad autónoma de Buenos Aires, 5% (38/754) de la provincia de Tucumán, 4% (33/754) de la provincia de Corrientes, 3% de la provincia de Salta (21/754) y 0,1% de la provincia de Tierra del Fuego (1/754).



**Figura 7. Distribución de la población de estudio según lugar de nacimiento.**

### **5.2 Estandarización y evaluación del rendimiento del Test ICT Chagas con el estándar de referencia.**

Para la estandarización y evaluación del rendimiento del test ICT Chagas se analizaron los parámetros diagnósticos en las diferentes condiciones de ensayo propuestas tal como se describe a continuación:

### **5.2.1 Rendimiento del ICT Chagas a diferentes tiempos de lectura utilizando sangre capilar**

La lectura del test ICT con matriz sangre capilar fue satisfactoria (resultados positivos para VP y negativos para VN) en 735/754 (97,5%), 736/754 (97,6%), y 737/754 (97,7%) de los ensayos leídos a los 25, 20 y 15 minutos respectivamente, mientras que el número de test inválidos fue 19/754 (2,5%), 18/754 (2,4%) y 17/754 (2,3%) respectivamente.

Los datos obtenidos mediante esta técnica se muestran resumidos en la tabla III. Como se puede observar en la misma, los valores de Sensibilidad, Especificidad, VPP y VPN presentan valores similares en los tres tiempos de lectura ensayados, con superposición de los intervalos de confianza para cada parámetro evaluado. Los datos del índice de concordancia Kappa, test McNemar y RV se muestran en la tabla VI.

El Índice de concordancia kappa fue igual a 0.85 y el Z (test de MacNemar) fue mayor al Z tabla en los tres tiempos de lectura ensayados.

Las Razones de Verosimilitud Positivas (RV+) resultaron menores a 10 y las Razones de verosimilitud negativas (RV-) presentó valores mayores a 0.10 en los tres tiempos de lectura ensayados.

#### **TABLA III. Sensibilidad, Especificidad, Valor predictivo Negativo y Positivo del ICT Chagas sangre capilar a diferentes tiempos de lectura**

ICT Chagas Tiempos de lectura	Sensibilidad		Especificidad		Valor Predictivo Positivo		Valor Predictivo Negativo	
	%	(IC %)	%	(IC %)	%	(IC %)	%	(IC %)
25 minutos	96.4	(93.6-98.0)	89.8	(86.6-92.3)	86.9	(83.3-90.5)	97.3	(95.7-98.9)
20 minutos	96.0	(93.2-97.7)	89.8	(86.6-92.3)	86.9	(83.3-90.5)	97.0	(95.3-98.7)
15 minutos	96.0	(93.2-97.7)	90.1	(86.9-92.6)	87.1	(83.5-90.7)	97.0	(95.3-98.7)

**TABLA VI. Índice de concordancia Kappa, Test McNemar y Razones de Verosimilitud del ICT Chagas sangre capilar a diferentes tiempos de lectura**

Prueba ICT Chagas Tiempos de lectura	Índice de concordancia a Kappa ( $\kappa$ )	Test McNemar (z)			Razón de verosimilitud	
		K	Z	Z SE	RV +	RV-
ICT Chagas 25 min sangre capilar	0.85	4.51	-1.96	0.01	9.45	0.11
ICT Chagas 20 min sangre capilar	0.85	4.33	-1.96	0.01	9.41	0.11
ICT Chagas 15 min sangre capilar	0.85	4.23	-1.96	0.01	9.69	0.10

### **5.2.2 Rendimiento del Test ICT Chagas en sangre entera con EDTA y suero.**

La lectura el test ICT con matrices sangre venosa y suero a tiempo de lectura de 20 minutos fue satisfactoria en 751/754 (99.6%) y 753/754 (99.8%) respectivamente, mientras que el número de test inválidos fue 3/754 (0.4%) y 1/754 (0,2%) de las muestras ensayadas respectivamente.

El análisis de los datos obtenidos de los ensayos del ICT Chagas con las matrices sangre entera y suero se muestran en la tabla V y VI.

En la tabla V se puede observar que la Sensibilidad del ICT Chagas utilizando sangre entera fue tres puntos mayor a la obtenida utilizando la matriz suero. Por otro lado, el VPN obtenido utilizando la matriz sangre entera fue dos puntos mayor que el obtenido utilizando la matriz suero. Sin embargo, la superposición de los intervalos de confianza indica que la Especificidad y el VPP fueron similares en las dos matrices ensayadas.

El índice de concordancia kappa fue mayor o igual a 0.88 y el Z (test de MacNemar) fue mayor al Z tabla en las dos matrices ensayadas.

Las RV+ resultaron mayores a 10 y las RV- menores a 0.10 en estas dos matrices ensayadas.

**TABLA V. Sensibilidad, Especificidad, Valor predictivo Negativo y Positivo del ICT Chagas en sangre entera con EDTA y suero.**

ICT Chagas Tiempo de lectura 20 min.	Sensibilidad		Especificidad		Valor Predictivo Positivo		Valor Predictivo Negativo	
	%	(IC %)	%	(IC %)	%	(IC %)	%	(IC %)
<b>Sangre Entera (EDTA)</b>	95.0	(92.0-97.0)	95.0	(93.0-97.0)	93.0	(90.2-95.8)	97.0	(95.4-98.6)
<b>Suero</b>	92.0	(89.0-95.0)	95.0	(93.0-97.0)	93.0	(90.1-95.9)	95.0	(93.0-97.0)

**TABLA VI. Índice de concordancia Kappa, Test McNemar y Razones de Verosimilitud del ICT Chagas suero y sangre entera.**

Prueba ICT Chagas Tiempos de lectura	Índice de concordancia Kappa ( $\kappa$ )		Test McNemar (z)			Razón de verosimilitud	
	K		Z	Z tabla	SE	RV +	RV-
<b>ICT Chagas 20 min Suero</b>	0.88		-0.45	-1.96	0.01	18.4	0.05
<b>ICT Chagas Sangre entera 20 min</b>	0.90		1.15	-1.96	0.01	19.0	0.05

**5. 3 Rendimiento del Test CHAGAS STAT - PAK en sangre entera obtenida con EDTA.**

La lectura de la prueba Chagas STAT-Pack obtenida utilizando matriz sangre entera fue satisfactoria en 753/754 (99.8%). Los datos obtenidos con este test se muestran en la tabla VII y VIII.

Como La sensibilidad y el VPN del Chagas STAT Pack fueron iguales a los observados con el test ICT Chagas utilizando la matriz sangre entera con similar especificidad. En cambio, el VPP obtenido fue ligeramente menor, con una mayor amplitud del IC que lo observado con el test ICT Chagas. El índice de concordancia kappa fue 0.89 y el Z (test de MacNemar) fue mayor al Z tabla.

Al igual que lo observado con el test ICT Chagas la RV+ resultó mayor a 10 y la RV- presentó valores menores de 0.01.

**TABLA VII. Sensibilidad, Especificidad, Valor predictivo Negativo y Positivo del Chagas STAT-Pack en sangre entera con EDTA.**

Chagas STAT Pack Tiempo de lectura 15 min.	Sensibilidad		Especificidad		Valor Predictivo Positivo		Valor Predictivo Negativo	
	%	(IC %)	%	(IC %)	%	(IC %)	%	(IC %)
<b>Sangre Entera (EDTA)</b>	95.0	(92.0-97.0)	94.0	(91.0-96.0)	91.0	(83.0-98.0)	97.0	(95.0-98.0)

**TABLA VIII. Índice de concordancia kappa, Test McNemar y Razones de Verosimilitud (RV+, RV-) del Chagas STAT Pack.**

Prueba	Indice de concordancia Kappa ( $\kappa$ )	Test McNemar (z)			Razón de verosimilitud	
	K	Z	Z tabla	SE	RV +	RV-
<b>STAT Pack Chembio 15 min Sangre entera</b>	0.89	2.17	-196	0.01	15.8	0.06

#### **5.4 Rendimiento del Test ICT Chagas en relación al área geográfica de riesgo de infección por *Trypanosoma cruzi*.**

Con el fin de evaluar el rendimiento del ICT Chagas en las diferentes muestras y tiempos de lectura relacionada al área de riesgo de contraer la infección por *T. cruzi* (Alto, Medio, Bajo o Nulo; Programa Nacional de Chagas, 2012), se analizó la sensibilidad, especificidad, VPP, VPN, y las RV+ y RV- del test según la procedencia de las personas que participaron del estudio.

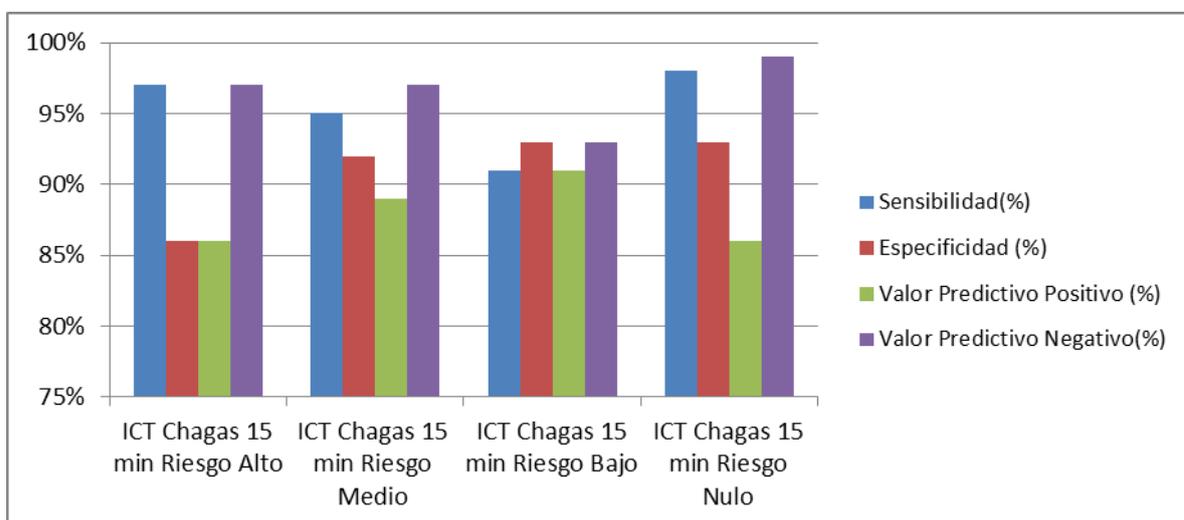
A continuación se describen los resultados obtenidos para cada una de las condiciones ensayadas:

- ***ICT Chagas sangre capilar.***

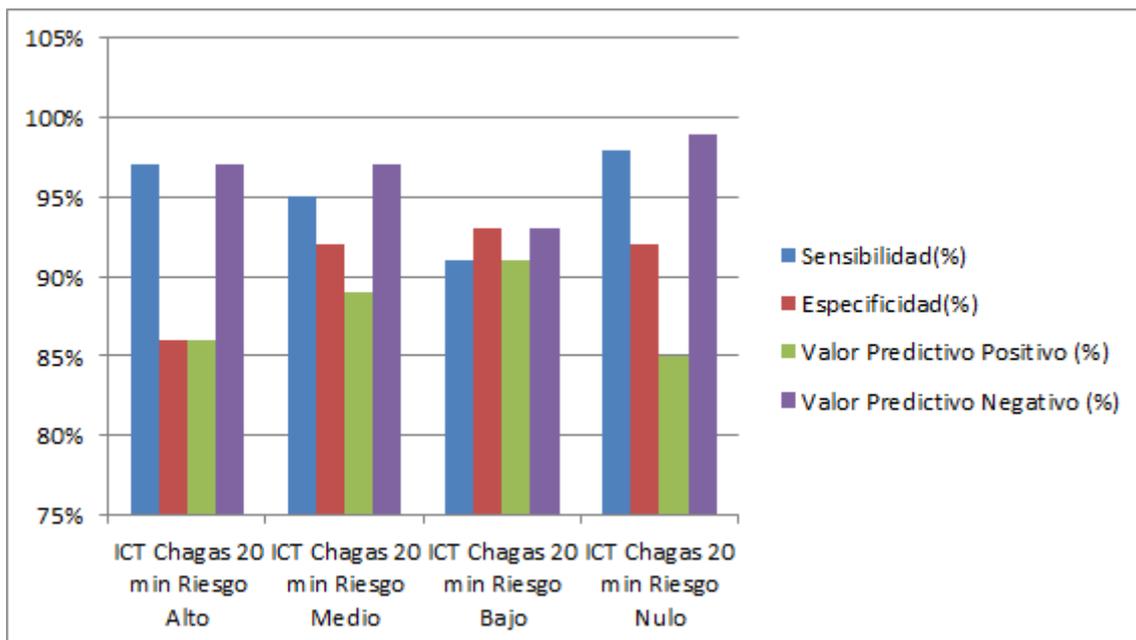
El análisis de los resultados de la prueba ICT Chagas utilizando matriz sangre capilar a tiempo de lectura de 15 y 20 minutos mostró que la sensibilidad varió desde 91% (IC 95%:78%-97%) a 98% (IC 95%: 88%-100%) y la especificidad

desde 86% (IC 95%: 81%-91%) a 93% (IC 95%: 87%-97%), según el área de riesgo [Gráfico 1 y 2].

El VPP varió desde 86% (IC 95%: 75%-95%) a 91% (IC 95%: 66%-100%) y el VPN desde 93% (IC 95%: 82%-98%) a 99% (IC 95%: 94%-100%), según el área de riesgo. Cuando se analizan los IC del 95% de los datos de cada parámetro se puede observar que hay superposición de los valores obtenidos en las diferentes áreas de riesgo evaluadas, indicando que el rendimiento de ICT Chagas utilizando matriz sangre capilar es independiente del área de procedencia de la muestra.[Gráfico 1 y 2.]



**Gráfico 1. Sensibilidad, Especificidad, VPP y VPN. ICT Chagas 15 minutos según riesgo.**



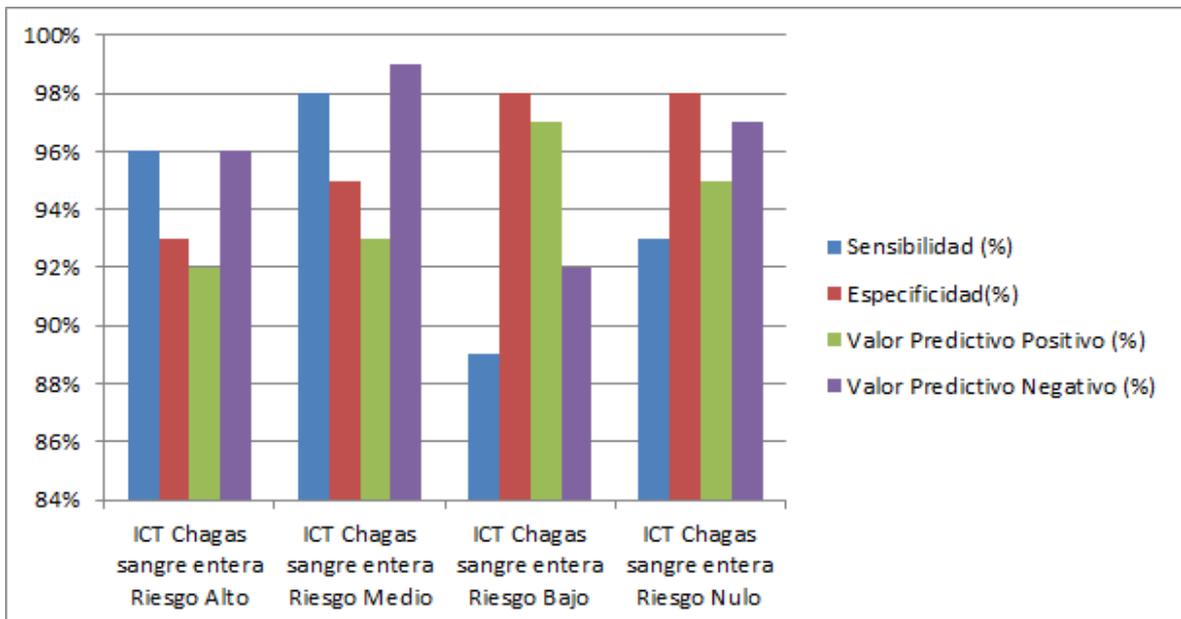
**Gráfico 2. Sensibilidad, Especificidad, VPP y VPN. ICT Chagas 20 minutos según riesgo.**

La RV+ del test utilizando matriz sangre capilar fue 7,1 en las áreas de Riesgo Alto, independientemente del tiempo de lectura. Estos valores denotan una pobre capacidad de la prueba para asociar el resultado con la presencia de la infección en estas áreas (valor mínimo sugerido para RV+ igual o mayor 10). En cambio, la RV+ con sangre capilar (rango: 12 a 15) superó el valor mínimo sugerido en las zonas de Riesgo Medio, Bajo y Nulo de transmisión [Gráfico 6], indicando su utilidad en para áreas de menor riesgo. El análisis de los valores de RV- con esta muestra fue variable en las diferentes áreas de riesgo (rango: 0,02 a 0,09). En ningún caso RV- superó el valor límite deseable de 0,1. [Gráfico 7].

- **ICT Chagas sangre entera.**

El análisis los datos obtenidos de la prueba ICT Chagas utilizando matriz sangre entera mostró que la sensibilidad varía desde 89% (IC 95% :74%-95%) a 98% (IC 95%: 92%-100%)y la especificidad varía desde 93% (IC 95%: 88%-95%) a 98% (IC 95%: 88%-100%), según el área de riesgo de transmisión [gráfico 3].

El VPP varía desde 92% (IC 95%: 80%-100%) a 97% (IC 95%: 69%-100%) y el VPN varía desde 92% (IC 95%: 80%-97%) a 99% (IC 95%: 95%-100%), según el área de riesgo de transmisión. El análisis de los IC del 95% de los datos utilizando sangre entera mostró que al igual que lo observado cuando se utilizó matriz sangre capilar, hay superposición de los valores para cada parámetro, independientemente de la procedencia de la muestra. [Gráfico 3]



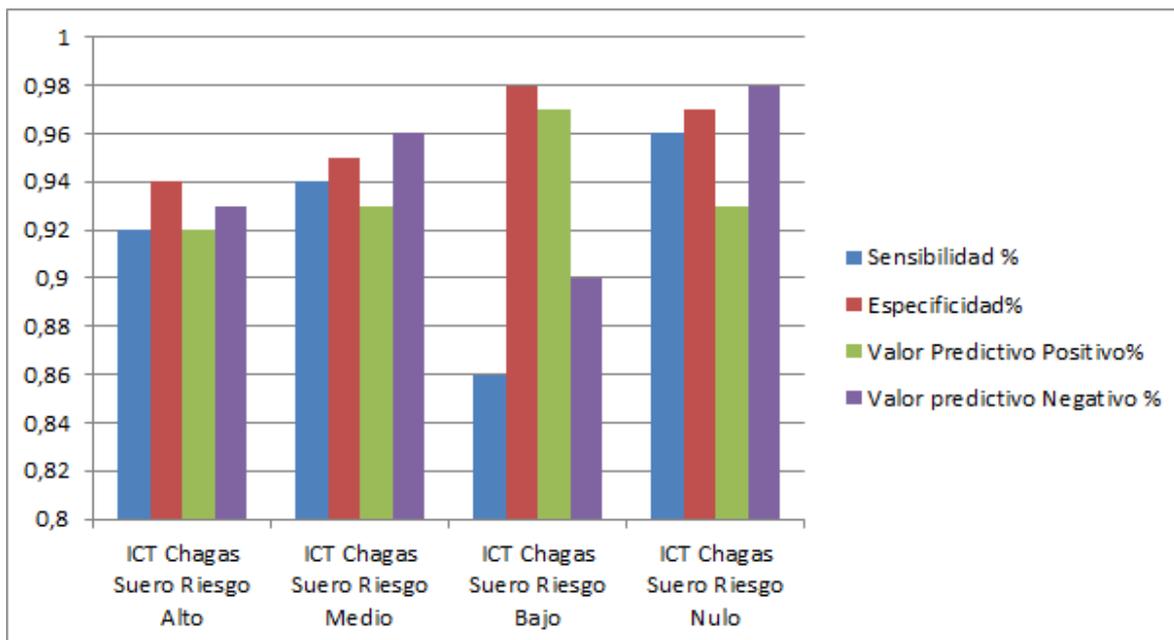
**Gráfico 3. Sensibilidad, Especificidad, VPP y VPN. ICT Chagas 20 minutos sangre entera según riesgo.**

El análisis de la prueba ICT Chagas utilizando matriz sangre entera mostró valores de RV+ que variaron desde 13 en área de riesgo Alto a 51 en áreas de riesgo Nulo. Sin embargo, cuando se analiza la RV- se detectó un valor de 0,12 en áreas de Riesgo Bajo mientras que se observaron valores menores a 0,1 en las otras áreas de transmisión sugiriendo que la prueba tendría menor valor diagnóstico en las áreas de bajo riesgo [gráfico 6 y 7].

- **ICT Chagas suero.**

Al analizar los datos obtenidos de la prueba ICT Chagas utilizando suero se observó que la sensibilidad varía desde 86% (IC 95%:71%-94%) a 96% (IC 95%: 85%-99%)y la Especificidad varía desde 94% (IC 95%: 89%-96%) a 98% (IC 95%: 88%-100%), según el área de riesgo de transmisión [Gráfico 4].

El VPP varía desde 92% (IC 95%: 81%-100%) a 97% (IC 95%: 69%-100%) y el VPN varía desde 90% (IC 95%: 78%-96%) a 98% (IC 95%: 93%-99%), según el área de riesgo de transmisión [gráfico 4]. El análisis de los IC del 95% de los datos muestra que, al igual que lo observado con matriz sangre capilar, hay superposición de los valores para cada parámetro, independientemente de la procedencia de la muestra. [Gráfico 4]



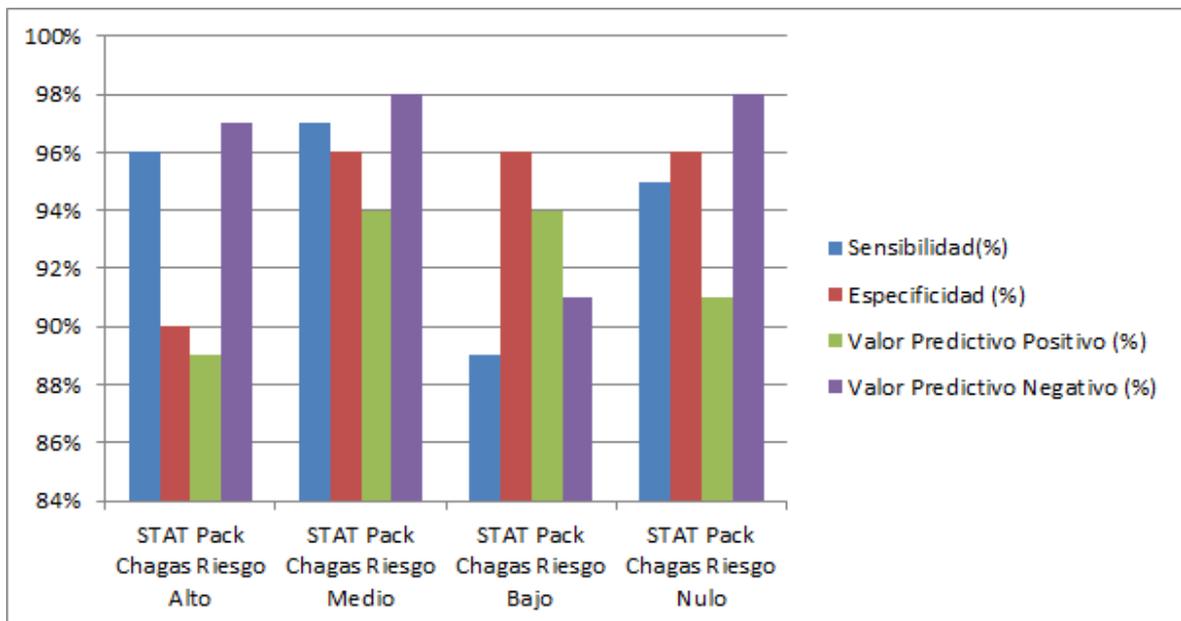
**Gráfico 4. Sensibilidad, Especificidad, VPP y VPN. ICT Chagas 20 minutos suero.**

El análisis de los datos de la prueba ICT Chagas realizada con matriz suero en relación al área de riesgo mostró valores de RV+ mayores a 10 y RV- menores a 0,1 indicando que la procedencia de la muestra tampoco afecta el rendimiento del mismo. [Gráfico 6 y 7]

- **STAT Pack sangre entera.**

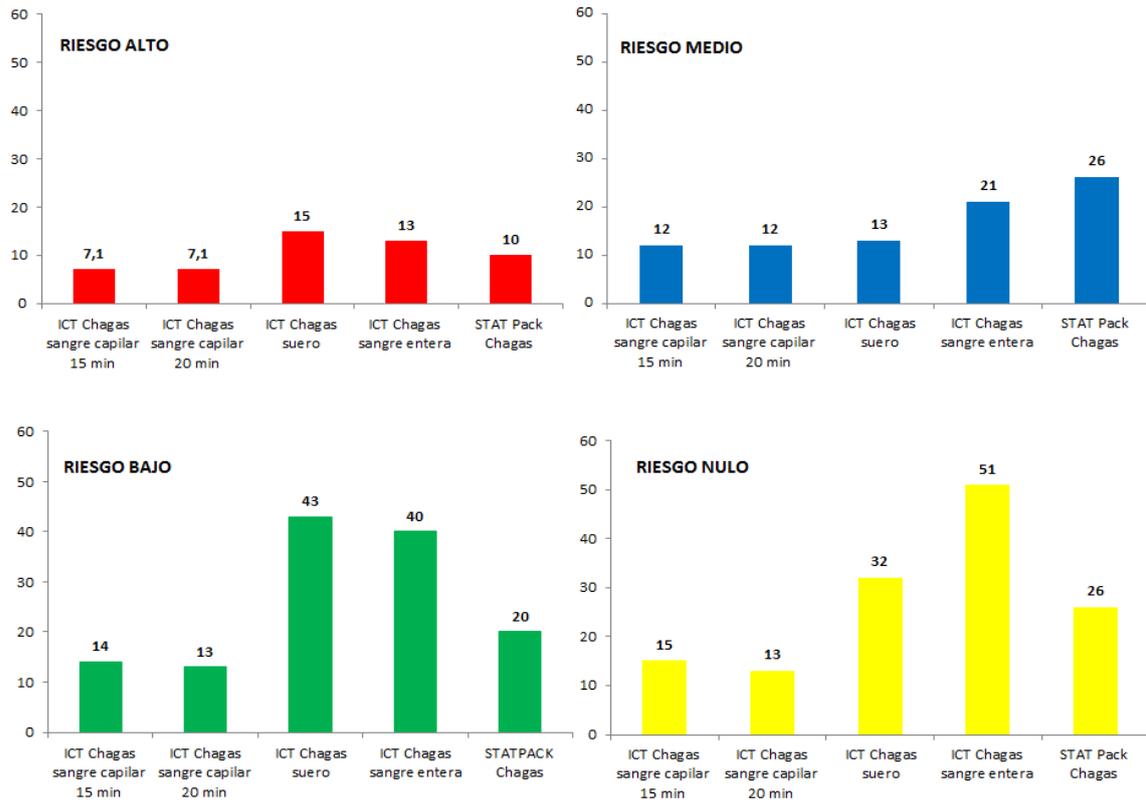
Con el fin de evaluar si la procedencia de las personas donantes influye sobre la variabilidad del rendimiento de la prueba STAT Pack Chembio utilizando como matriz sangre entera, se analizaron los resultados de los ensayos en relación al área de riesgo de infección por *T. cruzi*. La sensibilidad varía desde 89% (IC 95%:74%-95%) a 97% (IC 95%: 90%-99%) mientras que la especificidad varía desde 90% (IC 95%: 85%-94%) a 96% (IC 95%: 85%-99%). El VPP varía desde 89% (IC 95%: 78%-99%) a 94% (IC 95%: 67%-100%) y el

VPN varía desde 91% (IC 95%: 80%-97%) a 98% (IC 95%: 93%-99%), con superposición de los valores de los IC del 95% de las diferentes áreas de riesgo [Gráfico 5.]

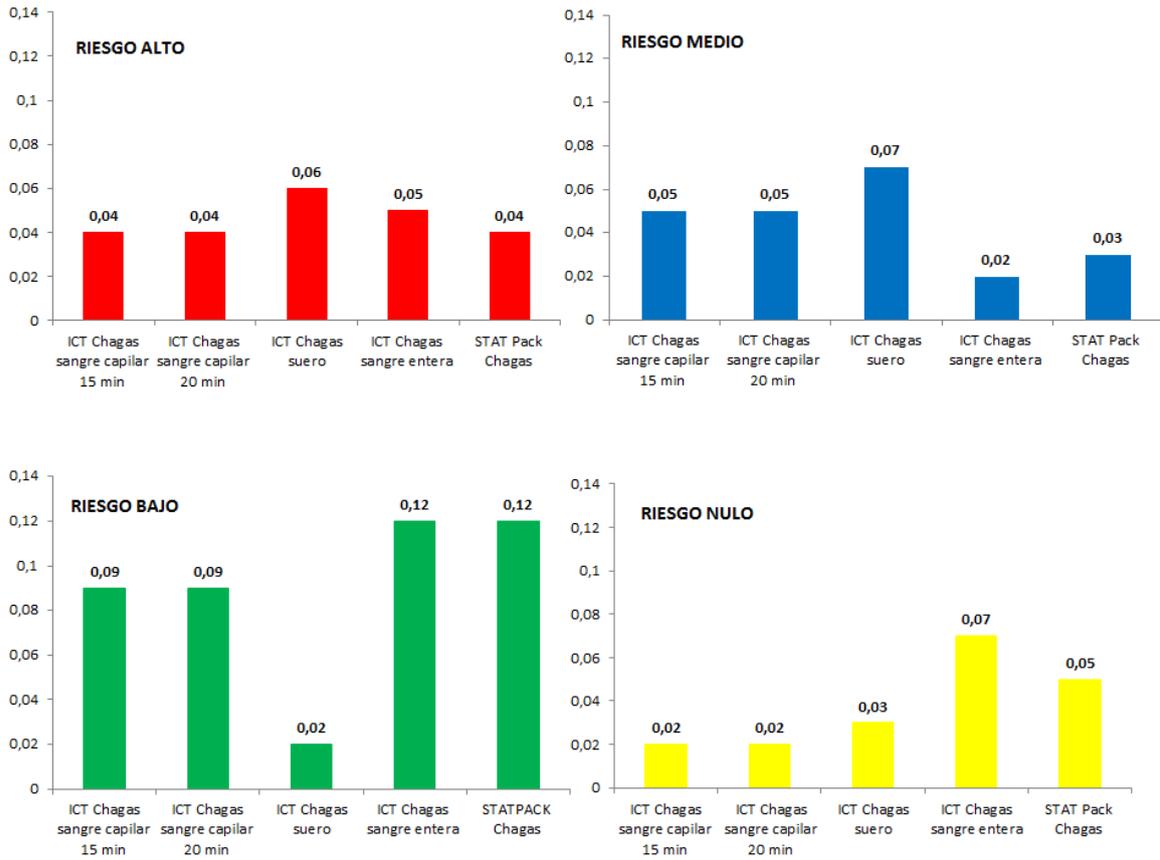


**Gráfico 5. Sensibilidad, Especificidad, VPP y VPN. STAT Pack Chagas Chembio 20 minutos sangre entera según riesgo.**

El análisis de la prueba Chagas STAT Pack Chembio utilizando como matriz sangre entera mostró valores de RV+ que variaron desde 13 en área de riesgo Alto a 51 en áreas de riesgo Nulo. Sin embargo, cuando se analiza la RV- se detectó un valor de 0,12 en áreas de Riesgo Bajo mientras que se observaron valores menores a 0,1 en las otras áreas de transmisión sugiriendo que la prueba tendría menor valor diagnóstico en las áreas de bajo riesgo [Gráfico 6 y 7].



**Gráfico 6. Razón de verosimilitud positiva de acuerdo al área geográfica de riesgo de transmisión por *T. cruzi*.**



**Gráfico 7. Razón de verosimilitud negativa de acuerdo al área geográfica de riesgo de transmisión por *T. cruzi*.**

## 6. Discusión

La enfermedad de Chagas es la causa más importante de miocarditis de origen infeccioso, y puede provocar lesiones irreversibles en el corazón y tracto gastrointestinal en una importante proporción de individuos infectados crónicamente con *T. cruzi*. Por esta razón las acciones de los programas de control de esta enfermedad están dirigidas principalmente a la eliminación de la transmisión del parásito como riesgo para la salud. La prevalencia de la infección es mayor en las regiones de alto riesgo de transmisión por la infestación de triatomíneos, sobre todo en zonas rurales remotas y de difícil acceso. Por lo tanto, es fundamental contar con herramientas confiables que aseguren el diagnóstico de la infección y ejecutar las medidas adecuadas para el control de la transmisión en las diferentes áreas geográficas e implementar el tratamiento correcto de las personas infectadas.

El diagnóstico de la infección por *T. cruzi* se basa actualmente en técnicas de laboratorios complejas que requieren equipamiento especializado para su realización y análisis además de personal altamente especializado. En general, los laboratorios que realizan el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* en las zonas rurales endémicas no cuentan con el equipamiento adecuado y suficientes recursos que les permita analizar un gran número de muestras siguiendo las BPL. En la actualidad los test rápidos de diagnóstico inmunoserológico para la enfermedad de Chagas son considerados como una herramienta útil para obtener resultados rápidos en estudio de campo. Según la OMS el test diagnóstico ideal debiera tener una sensibilidad y especificidad del 100%, ser fácil de realizar en un simple paso, económico y no requerir equipos

especiales o reactivos refrigerados (Medicos Sin Fronteras, Campaign for Acces to Essential Medicine, 2008). Un buen test rápido debería ofrecer además ventajas como posibilidad de almacenamiento a temperatura ambiente y no requerir personal experto sino que pueda ser realizado en las zonas rurales por personal local no profesional adecuadamente entrenado (Roddy y col; 2008).

El objetivo del presente estudio fue evaluar el rendimiento de un nuevo test diagnóstico de la infección por *T. cruzi* (Test ICT Chagas) en un centro de referencia para la enfermedad de Chagas. Dicho test se basa en la técnica de inmunocromatografía en tira de nitrocelulosa producido recientemente por la ONG PATH, utilizando un antígeno recombinante de *T. cruzi* desarrollado por Laboratorio Lemos de nuestro país. Con este propósito se colectaron muestras de sangre capilar del dedo índice, sangre venosa obtenida con EDTA del antebrazo y suero. Aproximadamente 10,8% de las muestras colectadas presentaron resultado discordante en los inmunoensayos de referencia. Dado que la sensibilidad y especificidad no se pueden calcular sin conocer el verdadero estatus de reactividad de las muestras y que en el estudio no contamos con una cuarta prueba diagnóstica que permita confirmar el estatus de VP y VN, se procedió a descartar las muestras con resultados discordantes en el test estándar de referencia. Un problema con este tipo de procedimiento consiste en que puede tender a sobreestimar el valor de los parámetros evaluados, resultando en un sesgo para el presente trabajo (Afonso, M.; Ebell, M.; Tarleton, R.; 2012).

Cuando se analizaron los parámetros que permiten determinar el rendimiento del test, la sensibilidad hallada para ICT Chagas utilizando como matriz sangre

capilar fue ligeramente mayor que cuando se utiliza la matriz sangre entera y suero, aunque con superposición de los IC. El análisis de la especificidad del ICT Chagas sangre entera obtenida con EDTA y suero arrojó valores con 5 puntos de diferencia respecto a los observados cuando se utilizaba sangre capilar, pero a pesar de ello se observó superposición de los IC. Cuando se utilizó la matriz sangre entera y suero, el valor VPP fue (93%) mayor al obtenido con sangre capilar (87%) sin superposición de los IC. Los VPN fueron similares (97%) utilizando la matriz sangre capilar y sangre entera y ligeramente menor cuando se utilizó suero con superposición de los IC en todas las matrices ensayadas. Estos resultados contrastan con los obtenidos en un estudio llevado a cabo por Barfield y col. (2011), quienes ensayaron el prototipo ICT Chagas con un total de 375 sueros clasificados (190 VP y 185 VN) provenientes de una seroteca perteneciente al Laboratorio Lemos; el valor de sensibilidad obtenido en dicho estudio fue de 99,5% y el valor de Especificidad fue de 96,8%, en general mayores a los obtenidos en nuestro trabajo.

También se incluyó en el presente estudio el rendimiento de un test con tecnología similar al test de estudio utilizado en numerosas investigaciones. Este test, denominado Chagas STAT Pack, producido por el laboratorio Chembio S.R.L, presentó un rendimiento similar al ICT Chagas ensayado con la matriz sangre entera obtenida con EDTA. En un estudio realizado con el test Chagas STAT Pack Roddy y col. detectaron que al incrementar el tiempo de lectura en intervalos de 5 minutos disminuye el porcentaje de resultados falsos negativos (Roddy col.; 2008). Apoyados en esta conclusión, estos autores recomendaron incluir la lectura a intervalos de 5 minutos desde los 15 a los 30

minutos en estudios de validación, de manera de asegurar que el tiempo de lectura sea el más adecuado para asignar la reactividad del test. Sin embargo, el ICT Chagas realizado con sangre capilar ensayado en tres tiempos de lectura (15, 20 y 25 minutos) en el presente trabajo no mostraron diferencias importantes entre los valores de la sensibilidad, especificidad, el VPP y el VPN.

Las causas por las que un test es considerado inválido incluyen la presencia de sangre en la ventana de lectura que imposibilite la observación del resultado o que la línea control esté ausente. En este estudio se observó mayor porcentaje de tests inválidos debido a la presencia de sangre en la ventana de lectura cuando la matriz utilizada era sangre capilar, mientras que la ausencia de la línea control fue la causa de invalidez de las otras matrices ensayadas. El porcentaje de inválidos cuando se utilizó sangre entera fue mucho menor que cuando se utilizó sangre capilar, y comparable con el valor obtenido para el Chagas STAT Pack, test con tecnología similar. Es posible que las diferencias del número de inválidos utilizando sangre de origen capilar y sangre venosa se relacionen con las características físicas y bioquímicas de ambos compartimientos así como también la falla en la tecnología de armado del dispositivo. Cuando se analizaron los valores de índice kappa se observó que el test ICT Chagas obtuvo un índice de concordancia muy bueno (0,85-0,90) en todas las condiciones ensayadas. La aplicación del test McNemar mostró que todos los valores de z obtenidos fueron mayores al z tabla, lo cual indica que no hubo diferencias entre el método en estudio respecto al test de referencia independientemente de la matriz utilizada.

En la práctica clínica es esencial conocer como el resultado de un test particular predice el riesgo de presentación de la enfermedad en cuestión. La

sensibilidad y la especificidad describen como los resultados de un test particular miden enfermedad o normalidad, pero dependen de la prevalencia de la enfermedad en la población de estudio, por lo que raramente pueden ser extendidos a la población general (Deeks, J. y Altman, D. 2009). Con el objetivo de independizarnos de la prevalencia de la población de estudio y evaluar el rendimiento del test resumiendo la información obtenida en un sólo parámetro, se calcularon las razones de verosimilitud positivas y negativas del test ICT Chagas en todas sus condiciones de ensayo y del test Chagas STAT Pack. La razón de verosimilitud positiva indica la probabilidad de que un test específico resulte positivo cuando una persona presenta la enfermedad en estudio. La razón de verosimilitud negativa indica la probabilidad de que un test específico resulte negativo en ausencia de la enfermedad. Estos parámetros de valoración de una prueba diagnóstica constituyen una herramienta que provee una ventaja con respecto a los valores predictivos positivos y negativos de un test debido a que, a diferencia de estos, no dependen de la proporción de personas que presentan la enfermedad en estudio sino de la sensibilidad y especificidad del test; de ahí su utilidad para comparar pruebas diagnósticas. Si la razón de verosimilitud es igual a 1, la probabilidad de diagnóstico es la misma antes que después de aplicar el test específico, en este caso, el test es inútil por no tener capacidad discriminante. La RV+ por encima de 10 y la RV- por debajo de 0,1 se consideran que proveen una fuerte evidencia para confirmar o descartar una enfermedad respectivamente en la mayoría de los casos (Deeks, J. y Altman, D. 2009). Las RV+ y RV- obtenidas con sangre entera y suero son mayores a 10 y menores a 0,1 respectivamente, indicando que el mismo posee una buena capacidad diagnóstica para confirmar y/o excluir la enfermedad en la mayoría

de las circunstancias, según interpretación de CP Evidence-based Medicine Working Group. En cambio, los ensayos de ICT Chagas con sangre capilar a diferentes tiempos de lectura mostraron valores dentro de los rangos considerados solo de moderada capacidad diagnóstica para confirmar y/o excluir la enfermedad (RV+ 5-9 y RV- 0,1-0,2, respectivamente, según interpretación de CP Evidence-based Medicine Working Group). Por otro lado los resultados obtenidos con el test Chagas STAT Pack fueron similares, sugiriendo que el ICT Chagas utilizando estas dos matrices (suero y sangre entera) presenta rendimientos comparables.

En un estudio llevado a cabo por Sosa Estani y col. con el STAT Pack en sangre de cordón umbilical en diferentes áreas de riesgo de la transmisión por *T. cruzi* se describen resultados heterogéneos de sensibilidad y por lo tanto del rendimiento del test en las mismas (Sosa Estani y col.;2008). En el presente trabajo, con el fin de evaluar posibles variaciones en el rendimiento del ICT Chagas se analizaron los parámetros de valoración diagnóstica de una prueba en función del área de riesgo de transmisión de *T. cruzi* del grupo de estudio. Se observó que tanto la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN para el ICT Chagas en su diferentes tiempos de lectura y matrices ensayadas presentaron valores variables con superposición de los IC 95%, indicando que no existen diferencias en el rendimiento del test en las diferentes áreas de transmisión analizadas. Los mismos resultados fueron obtenidos con el Chagas STAT Pack.

El análisis de las razones de verosimilitud positiva y negativa del ICT Chagas en relación al origen de los participantes del estudio utilizando como matriz sangre capilar mostró una moderada capacidad del test para confirmar el

diagnóstico de la enfermedad en áreas de alto riesgo de transmisión y buena capacidad para excluir la misma en áreas de bajo riesgo. En cambio la comparación de las razones de verosimilitud positiva y negativa del ICT Chagas sangre entera y STAT Pack mostró una buena capacidad de ambos test para confirmar el diagnóstico en áreas de alto riesgo y una moderada capacidad para excluir la enfermedad en áreas de bajo riesgo. Todos los test ensayados presentaron buena capacidad diagnóstica, tanto para confirmar como para excluir la enfermedad con muestras obtenidas provenientes de participantes originarios de áreas riesgo medio y nulo.

Otros autores evaluaron el rendimiento del STAT Pack en pacientes provenientes de América del Sur y América Central y obtuvieron valores de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN variables (Chiappaux, J.P 2009, Otani, M.M. 2009, Roddy, P. 2008 y Sosa Estani, S. 2008). Una hipótesis sugerida por estos autores como causa de las variaciones podría ser la distribución de las UDT parasitarias en las regiones de transmisión de la enfermedad de Chagas y donde estos tests son probados o ensayados. Estas posibles variaciones antigénicas podrían resultar en la producción de anticuerpos diferentes que no pueden ser detectados por todos los tests rápidos ya que cada uno se compone de antígenos recombinantes que varían en las diferentes preparaciones de acuerdo a la marca utilizada (Zingales y col.; 2012 y Sánchez-Camargo, C. 2014).

Las características mínimas de rendimiento requeridas para una prueba de tamizaje para vigilancia de Chagas son de 100% de sensibilidad y 95% de especificidad (WHO, 2012) donde la sensibilidad es de mayor importancia porque registra la mayor cantidad de infecciones verdaderas como sean

posibles, mientras que una especificidad más baja es más aceptable que en una prueba secundaria de confirmación. En el presente trabajo los test rápidos ensayados poseen menor sensibilidad que los test serológicos más sofisticados (ELISAs, WB, IFI); este déficit relativo de sensibilidad se compensa con su facilidad de uso, menor costo y la capacidad de proveer resultados inmediatos. Este último punto es crucial ya que podría ser mayor el número de personas en riesgo que tengan acceso a un diagnóstico y a un tratamiento oportuno.

## 7. Conclusión

El presente trabajo de Tesis de Maestría, realizado en un centro de referencia con una prevalencia de 48% de infección por *T. cruzi*, demuestra que el test ICT Chagas posee buena capacidad diagnóstica cuando se utiliza sangre entera con EDTA y suero, comparable al test actualmente disponible en el mercado local (Chagas STAT-PACK) y moderada capacidad diagnóstica cuando se utiliza sangre capilar. Por lo tanto, se puede concluir que el test ICT Chagas puede ser utilizado para estudios de tamizaje y vigilancia epidemiológica en áreas endémicas y no endémicas que requieran de rapidez diagnóstica, facilidad de realización por personal no profesional debidamente entrenado y no requieran de refrigeración para su almacenamiento. Sin embargo, se recomienda determinar su rendimiento en la población general del área geográfica específica a ser utilizado, previamente a su aplicación como herramienta de tamizaje. Igualmente los resultados positivos deben ser confirmados por el laboratorio de referencia con las técnicas convencionales de diagnóstico utilizadas en la actualidad. Cabe destacar que la enfermedad de Chagas está incluida dentro de las enfermedades de importancia como problema de Salud Pública y estos test tendrían su mayor utilidad en estudios poblacionales para la construcción de índices que permiten tomar acciones por parte de los programas de control y prevención de la transmisión vectorial y no vectorial en cada área evaluada. Por lo tanto, estudios de este tipo son deseables y de extrema utilidad para mejorar aún más las herramientas disponibles hasta el momento. En un futuro, es recomendable la utilización de

dos test rápidos en simultáneos que permitan mejorar los valores de sensibilidad de los mismos.

## 8. Bibliografía

Abramo Orrego L, Lansetti JC, Bozzini JP, Wynne de Martini GJ., 1980. Hemoculture as a diagnostic method in Chagas disease. *Medicina (B Aires)*. 1980;40 Suppl 1:56-62.

Acquatella H., Gomez-Mancebo J.R., Cataliotti F., Dávalos V., Villalobos L., de Alvarado M., 1985. Evaluación de un programa de control de Triatomas con insecticidas en San Juan de los Morros, Venezuela. *Ann. Soc. belge Med. trop.* 65 (Supl. 1): 197-211.

Afonso A.M., Ebell M.H., y Tarleton R.L., 2012. A Systematic Review of High Quality Diagnostic Tests for Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012 Nov; 6(11): e1881.doi: 10.1371/journal.pntd.0001881

Alvarez M., Cerisola J.A. y Rohweder R.W., 1968. Immunofluorescence test in the diagnosis of Chagas' diseases. *Bol Chil Parasitol* 23: 4-9.

Alvarez M, De Rissio AM, Wynne de Martini GJ, Orrego LA, Cerisola JA., 1971. Recolección de sangre en papel para diagnóstico de infección chagásica por inmunofluorescencia. *Bol Chil Parasitol.* 26(1):1-6.

Barfield CA, Barney RS, Crudder CH, Wilmoth JL, Stevens DS, Mora-Garcia S, Yanovsky MJ, Weigl BH, Yanovsky J, 2011. A highly sensitive rapid diagnostic test for Chagas disease that utilizes a recombinant *Trypanosoma cruzi* antigen. *IEEE Trans Biomed Eng.* 58(3):814-7. doi: 10.1109/TBME.2010.2087334.

Brenière SF, Waleckx E, Barnabé C., 2016. Over Six Thousand

Trypanosoma cruzi Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. PLoS Negl Trop Dis. 29;10(8):e0004792. doi: 10.1371/journal.pntd.0004792

Briceño D., Caballero G., Lares M., Vietri M., Medina M., Ferrer E., 2012. Diagnóstico inmunológico de enfermedad de Chagas a partir de muestras colectadas en papel de filtro. Salus vol.16 no.1 Valencia.

Brisse S, Barnabé C, Tibayrenc M., 2000. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. Int J Parasitol. 30(1):35-44.

Brown LD, Cat TT, DasGupta A, 2001. Interval Estimation for a proportion. Statistical Science 16: 101-133

Cameron AR, 1999. Survey Toolbox for Livestock Diseases - A practical manual and software package for active surveillance of livestock diseases in developing countries. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia.

Cameron AR, and Baldock FC, 1998. A new probability formula for surveys to substantiate freedom from disease. Prev. Vet. Med. 34: 1-17

Cerisola J.A, Alvarez M., Lugones H. y Rebosolán J.B., 1969. Sensibilidad de las reacciones serológicas para el diagnóstico de enfermedad de Chagas. Bol. Chile Parasitol. 24:2.

Cerisola JA, Alvarez M, de Martini GJW y Bonacci H., 1971. La reacción de hemaglutinación cualitativa para el diagnóstico de enfermedad de Chagas. Bioq

Clin 5: 94-97.

Chagas C., 1909. Nova Tripanosomiae humana. Estudos sobre a morfología e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi: n. Gen., n. Sp., agente etiologico de nova entidade morbida do homen. Men Inst. Oswaldo Cruz 1:1909

Chappuis F, Mauris A, Holst M, Albajar-Vinas P, Jannin J, Luquetti AO, Jackson Y., 2010. Validation of a rapid immunochromatographic assay for diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection among Latin-American Migrants in Geneva, Switzerland. J Clin Microbiol. 48(8):2948-52. doi: 10.1128/JCM.00774-10.

Chiari E, Dias JCP, Lana M, Chiari CA., 1989. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas disease. Rev Soc Bras Med Trop;22:19-23.

Chippaux JP, Santalla JA, Postigo JR, Romero M, Salas Clavijo NA, Schneider D, Brutus L., 2009. Sensitivity and specificity of Chagas Stat-Pak test in Bolivia. Trop Med Int Health. 2009 Jul;14(7):732-5. doi: 10.1111/j.1365-3156.2009.02288.x.

Chuit R, Subias E, Pérez AC, Paulone I, Wisnivesky-Colli C, Segura EL.,1989. Usefulness of serology for the evaluation of *Trypanosoma cruzi* transmission in endemic areas of Chagas' disease. Rev Soc Bras Med Trop.;22(3):119-24.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Assessment of the Diagnostic Accuracy of Laboratory Tests Using Receiver Operating Characteristic Curves”; EP24-A2 Approved Guideline—Second Edition. 2011.

Clinical and Laboratory Standards Institute. User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline—Second Edition EP12-A2 Vol. 28 No. 3 Replaces EP12-A Vol. 22 No. 14.

Cura EN, Ruiz AM, Velazquez E, Malagrino N, Orn A, Segura EL., 1993. Estandarización de un Kit de confirmación (FATALAKIT) para el Inmunodiagnóstico de la infección por el *Trypanosoma cruzi*. Medicina (Buenos Aires) 53: 82.

Da Silva L.J., 1985. A doença de Chagas no Brasil. Índícios de sua ocorrência e distribuição até 1909. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 27:219-223.

De Rissio AM, Riarte AR, Martín García M, Esteva MI, Quaglino M, Ruiz AM, 2010. Congenital *Trypanosoma cruzi* infection. Efficacy of Its Monitoring in a Urban Reference Health Center in a Non-Endemic Area of Argentina. Am J Trop Med Hyg 82(5): 838-845.

Duffy T, Cura CI, Ramirez JC, Abate T, Cayo NM, Parrado R, Bello ZD, Velazquez E, Muñoz-Calderon A, Juiz NA, Basile J, Garcia L, Riarte A, Nasser JR, Ocampo SB, Yadon ZE, Torrico F, de Noya BA, Ribeiro I, Schijman AG., 2013. Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* satellite DNA in blood samples. PLoS Negl Trop Dis.;7(1):e2000. doi: 10.1371/journal.pntd.0002000. Epub 2013 .

Feilij H, Muller L, Gonzalez Cappa SM., 1983. Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas' disease. J Clin Microbiol. Aug;18(2):327-30.

Gourbière S., Dorn P., Tripet F., Dumonteil E., 2012. Genetics and evolution of triatomines: from phylogeny to vector control. *Heredity (Edinb)*;108(3):190-202. doi: 10.1038/hdy.2011.71. Epub 2011 Sep 7

Guerra F., 1970. American Trypanosomiasis. An historical and human lesson. *J. Trop. Me. Hyg.* 73:83-104.

Hoare, C. A., 1972. *The trypanosoms of mammals.* Blackwell, Oxford  
Adaptation, Saunders.

Manual de Laboratorio, Octava edición, 1996. Enfermedad de Chagas y otras Parasitosis. Instituto Nacional de Chagas Dr. Mario Fatala Chaben, Buenos Aires, Argentina.

Maelkelt G.A., 1983. La epidemiología de enfermedad de Chagas en relación con el ecosistema domiciliario. *Interciencia (venezuela)* 8:353-366

Ministerio de Salud de la Nación, Agosto 2012. Guías para la atención del paciente infectado con *Trypanosoma cruzi* (Enfermedad de Chagas). Resol. Ministerial \_\_\_\_\_ en \_\_\_\_\_ trámite.  
[http://www.msal.gob.ar/chagas/images/stories/Equipos/Guia\\_Nacional\\_Chagas\\_version\\_27092012.pdf](http://www.msal.gob.ar/chagas/images/stories/Equipos/Guia_Nacional_Chagas_version_27092012.pdf)

Newcombe RG, 1998. Two-sided confidence intervals for the single proportion: comparison of seven methods. *Statistics in Medicine.* 17:857-872.

Normas de Diagnóstico de la Infección por *T. cruzi*, INP “Dr. Mario Fatala Chaben”, ANLIS Malbrán. Ministerio de Salud, revisión Octubre 2012(La presente modificación actualiza la última normativa aprobada por Resolución

523/97).

Normas Técnicas de Hemoterapia (Resolución Ministerial N° 865/06), Ministerio de Salud de La Nación.

Luquetti AO, Ponce C, Ponce E, Esfandiari J, Schijman A, Revollo S, Añez N, Zingales B, Ramgel-Aldao R, Gonzalez A, Levin MJ, Umezawa ES, Franco da Silveira J. , 2003. Chagas' disease diagnosis: a multicentric evaluation of Chagas Stat-Pak, a rapid immunochromatographic assay with recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi*. *Diagn Microbiol Infect Dis.*;46(4):265-71.

Organización Mundial de la Salud, 2002. Control of Chagas disease. WHO technical report series, no. 905. Geneva, Switzerland.  
[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42443/1/WHO\\_TRS\\_905.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42443/1/WHO_TRS_905.pdf)

Organización Mundial de la Salud. La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). Nota descriptiva N°340, Agosto de 2012  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/index.html>

Organización Mundial de la Salud (WHO), weekly epidemiological record. N°6, 2015, 90, 33-44 <http://www.who.int/wer>

Organización Mundial de la Salud (WHO)., 2009. Recommendations Screening Donated Blood for Transfusion-Transmissible Infections.  
<http://www.who.int/bloodsafety/ScreeningTTI.pdf>

Pinto Dias J.C., 1985. Aspectos socioculturais e economicos na expansão e no controle da doença de Chagas humana. *Ann. Soc. belge Med. Trop. (Supl.1):* 119-126.

Ponce C., Ponce E., Vinelli E., Montoya A., de Aguilar V., Gonzalez A., Zingales B., Rangel-Aldao R., Levin M.J., Esfandiari J., Umezawa E.F, Luquetti A.O. y da Silveira J.F., 2005. 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. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 5065–5068.

López de Ullibarri Galparsoro, I. y Pita Fernández, S. 1999 Medidas de concordancia: el índice de Kappa. *Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario-Universitario Juan Canalejo. A Coruña (España) Cad Aten Primaria* 6: 169-171.

Pértega Díaza S., Pita Fernández, S., 2004. Asociación de variables cualitativas : El test exacto de Fisher y el test de McNemar. *Fisterra, Atención Primaria*. Portela-Lindoso A.A.B. y Shikanai-Yasuda M.A., 2003. Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase *Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction. Rev. Saúde Pública* vol.37 no.1 São Paulo. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102003000100016>.

Programa Nacional de Chagas, 2012.

<http://www.msal.gob.ar/chagas/index.php/institucional/programa-nacional-de-chagas>

Roddy P, Goiri J, Flevaud L, Palma PP, Morote S, Lima N, Villa L, Torrico F, Albajar-Viñas P., 2008. Field evaluation of a rapid immunochromatographic

assay for detection of *Trypanosoma cruzi* infection by use of whole blood. J Clin Microbiol. 2008 Jun;46(6):2022-7. doi:10.1128/JCM.02303-07.

Ruiz, AM; Búa, J; García, GA., 2004. La Enfermedad de Chagas.. Parasitosis Regionales. Sixto Raul Costamagna. P:23-55. 2ª Edición (Reimpresión). Mayo 2008.

Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejia Jaramillo AM, Cura C, Auter F, Veron V, Qvarnstrom Y, Deborggraeve S, Hajar G, Zulantay I, Lucero RH, Velazquez E, Tellez T, Sanchez Leon Z, Galvão L, Nolder D, Monje Rumi M, Levi JE, Ramirez JD, Zorrilla P, Flores M, Jercic MI, Crisante G, Añez N, De Castro AM, Gonzalez CI, Acosta Viana K, Yachelini P, Torrico F, Robello C, Diosque P, Triana Chavez O, Aznar C, Russomando G, Büscher P, Assal A, Guhl F, Sosa Estani S, DaSilva A, Britto C, Luquetti A, Ladzins J. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. PLoS Negl Trop Dis. 2011 Jan 11;5(1):e931. doi: 10.1371/journal.pntd.0000931.

Schmunis A. Gabriel. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. Mem Inst Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil) Vol. 102(suppl I): 75-85, 2007.

Schofield CJ, Jannin J, Salvatella, R. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol* (2006) 22:583-588.

Segura EL, Cura EN, Estani SA, Andrade J, Lansetti JC, de Rissio AM, Campanini A, Blanco SB, Gürtler RE, Alvarez M., 2000. Long-term effects of a nationwide control program on the seropositivity for *Trypanosoma cruzi* infection

in young men from Argentina. *Am J Trop Med Hyg.* 2000 Mar;62(3):353-62.

Segura, Elsa L; Pérez, Analía C; Yanovsky, Jorge F; Andrade, Jorge; Wynne de Martini, Gladys J. 1986. Disminución en la prevalencia de infección por *Trypanosoma cruzi* (enfermedad de Chagas) en hombres jóvenes de la Argentina / Decrease in the prevalence of infection by *Trypanosoma cruzi* (Chagas'disease) in young men of Argentina *Bol. Oficina Sanit. Panam;*100 (5):493-510.

Segura EL., Ruiz AM., 1992. *Trypanosoma cruzi*. En *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Ed Perea EJ, Edic. DOYMA, Madrid, España. Cap. 82: 989-994.

Scott I.A, Greenberg P.B and Poole P.J.,2008. Cautionary tales in the interpretation of studies of diagnostic tests. *Internal Medicine Journal* 38 : 120-129.

Sosa-Estani S., Gamboa-León M.R., del Cid-Lemus J., Althabe F., Alger J., Almendares O., Cafferata M.L. , Chippaux J.P, Dumonteil E., Gibbons L., Padilla-Raygoza N., Schneider D., Belizán J.M., Buekens P., and Working Group, 2008. Short Report: Use of a Rapid Test on Umbilical Cord Blood to Screen for *Trypanosoma cruzi* Infection in Pregnant Women in Argentina, Bolivia, Honduras, and México. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 79(5), pp. 755–759.

STARD 2015: an updated list of essential items for reporting diagnostic accuracy studies *BMJ* 2015;351:h5527 doi: 10.1136/bmj.h5527

Verani JR, Seitz A, Gilman RH, LaFuente C, Galdos-Cardenas G, Kawai V, de LaFuente E, Ferrufino L, Bowman NM, Pinedo-Cancino V, Levy MZ, Steurer

F, Todd CW, Kirchhoff LV, Cabrera L, Verastegui M, Bern C., 2009. Geographic variation in the sensitivity of recombinant antigen-based rapid tests for chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg.*;80(3):410-5.

Yanovsky J., Marra M.J., Di Spagna P.P., 1994. XXXth International Congress on Military Medicine. June 5-11. Augsburg, Germany.

Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG; Second Satellite Meeting. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104(7):1051-4.

Zingales B<sup>1</sup>, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol.* 12(2):240-53. doi: 10.1016/j.meegid.2011.12.009. Epub 2011 Dec 27.

## ANEXO I

### PROGRAMA DE TECNOLOGIA APROPIADA EN SALUD (PATH)

#### FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO DE ESTUDIO ICT CHAGAS

Karenina Scollo	Bioquímica, Instituto Fatala
54-11-4331-2330	

Andrés Mariano Ruiz, MD	Director, Instituto Fatala
54-11-4331-2330	
Christopher Crudder MSc	Coordinador de investigación clínica y en terreno,

206/302-4733 PATH

Shirley Villadiego, MD, MPH	Oficial superior de programas, PATH
206/744-6960	

Matthew Steele PhD, MPH	Oficial superior de programas, PATH
206/302-4740	
Cori Barfield Investigadora especialista, PATH	
206/302-4736	

#### DECLARACION DE LOS/AS INVESTIGADORES

Le pedimos que participe de un estudio de investigación que ayudará a PATH, una organización internacional de salud pública, a evaluar más rápido y de forma simple pruebas que podrán asegurar si alguien se ha infectado con el germen que causa la enfermedad de Chagas. El propósito de este formulario de consentimiento es entregarle la información que necesitará para ayudarle a

decidir si quiere participar en este estudio. Ud. podrá hacer preguntas acerca del propósito del estudio, lo que le pediríamos que hiciera, los posibles riesgos y beneficios, sus derechos como voluntario/a y cualquier otra cosa que no esté clara acerca del estudio o este formulario. Cuando hayamos contestado todas sus preguntas, Ud. podrá decidir si quiere participar o no. A este proceso se le llama “consentimiento informado”. Le daremos una copia de este formulario para sus registros. Este consentimiento puede tener palabras que Ud. no entienda. Por favor pídale al o la doctor/a del estudio que le explique cualquier pregunta o le de la información que Ud. no entienda de manera clara. Ud. se podrá llevar una copia no firmada de este formulario de consentimiento para que pueda pensar o hablarlo con su familia o amigos antes de tomar su decisión.

### **PROPOSITO**

Este estudio busca ayudarle a los/as investigadores/as de PATH a probar que tan bien funciona una prueba rápida para detectar un componente del sistema inmune del cuerpo que ayudará a determinar si alguien está infectado/a con Chagas. Los/as doctores/as podrán usar la nueva prueba rápida en lugares lejanos para saber si el o la paciente necesita medicamentos para curarse de la enfermedad de Chagas.

### **BENEFICIOS**

En muchas partes de América del Sur y Centroamérica, la enfermedad de Chagas es un problema importante para la salud pública. En algunos lugares lejanos, los/as trabajadores/as de la salud no cuentan con pruebas de bajo costo, que sean sencillas y rápidas que les indiquen cuando sus pacientes están infectados/as con el germen que causa la enfermedad de Chagas y si deberían tomar medicamento. Si Ud. participa de este estudio nos permitirá evaluar una prueba simple para determinar si alguien está infectado/a con el germen de Chagas. La prueba puede comprarse y utilizarse en estas partes del mundo. Sin embargo, no se beneficiará de ninguna manera al participar de este estudio. Si elige participar en este estudio o no, no modificará la forma en que sea atendido/a en esta clínica u otras clínicas.

## **PROCEDIMIENTOS**

Si Ud. está de acuerdo en participar, le pediremos que done alrededor de 3 cucharaditas de sangre. Pincharemos su dedo con una aguja pequeña para obtener unas gotas de sangre. La sangre de su dedo será utilizada para propósitos del estudio. También le sacaremos sangre de una vena en su brazo. Sacaremos suficiente sangre de su brazo para hacer los exámenes de laboratorio que Ud. normalmente recibe, y además sacaremos un poco extra para propósitos de este estudio. Intentaremos llevar a cabo esta donación de sangre en un horario que le acomode a Ud. La sangre que done recibirá un número de estudio por parte del personal del Instituto Fatala que no estará asociado a su información médica ni a ninguna otra información que lo/a identifique. Utilizaremos esta sangre inmediatamente en la prueba rápida de Chagas y lo compararemos con una prueba estándar que se sabe funciona bien. Se botará toda la sangre que no se utilice en este estudio.

## **RIESGOS, ESTRES O INCOMODIDAD**

Puede ser incómodo o doloroso donar sangre cuando la aguja es insertada en su vena o en su dedo. Ud. podría desarrollar moretones, sangrado o infección en el lugar de donde se extraiga la sangre. Puede sentirse mareado/a o desmayarse a causa de la donación de sangre. Las probabilidades de un daño relacionado con la investigación son bajas. En el caso que ocurriera, cualquier costo será cubierto por PATH.

## **COSTOS**

El participar en el estudio no tiene costos para Usted.

## **PAGO POR PARTICIPACION**

Ud. recibirá 70 pesos en efectivo por su participación. El dinero se le entregará al haber entregado su muestra de sangre.

## **OTRA INFORMACION**

La participación en este estudio es voluntaria. Ud. puede decir no o detenerse en cualquier momento. El participar en el estudio no modifica su atención en salud en el Instituto Fatala o en otra parte. Le pediremos que done sangre solamente una vez y solamente tardará unos minutos. El pinchazo en el dedo solo tomara unos pocos minutos de su tiempo. Solamente los/as investigadores/as de PATH y el Instituto Fatala tendrán acceso a los datos creados durante este estudio. Los datos se guardarán en un archivo bloqueado y en una computadora con acceso limitado. Los datos serán completamente anónimos. No existirá forma de vincular los datos o los resultados de la prueba de Chagas a las personas que donaron la sangre. Los resultados de la prueba de PATH no se le entregaran a Usted y no serán parte de sus registros médicos. Cualquier reporte público de este estudio no incluirá información acerca de usted.

Algunas personas tienen el derecho de revisar la información recolectada en este estudio para asegurarse que la información es correcta. Esto incluye personal de PATH y del Instituto Fatala quienes están realizando es estudio, y las personas que trabajan en PATH y en el Instituto Fatala quienes se aseguran que es estudio es hecho de manera correcta y que sus derechos son protegidos (ellos son llamados Comité de Investigación Ética), y las personas que están pagando por el estudio, llamados el Instituto Nacional de Bioingeniería e Imagen.

## **PREGUNTAS PARA CONFIRMAR SU ENTENDIMIENTO DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO**

¿Participación en este estudio incluye extracción de sangre? SI/NO

¿Participación en este estudio incluye un pinchazo en el dedo? SI/NO

¿Puede Usted parar la participación en este estudio una vez que usted decida ser voluntario? SI/NO

¿Se le pagaran 70 pesos para reembolsar los gastos de viaje para este estudio? SI/NO

**NOTA PARA EL INVESTIGADOR**

**SI EL PARTICIPANTE NO CONTESTA A ESTAS PREGUNTAS DE MANERA CORRECTA, POR FAVOR REPITA LA EXPLICACION DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO Y PREGUNTE LAS PREGUNTAS NUEVAMENTE. POR FAVOR NO REGISTRE A EL/LA PARTICIPANTE SI EL/ELLA NO CONTESTA A ESTAS PREGUNTAS CORRECTAMENTE DESPUES DE DOS INTENTOS.**

---

Nombre de la persona que obtiene consentimiento	Firma de la persona que obtiene Consentimiento
---	--

FECHA:

## **ANEXO II**

### **Formulario de Asentimiento del Niño**

**TÍTULO DEL ESTUDIO:** Evaluación de la sangre entera de ICT Chagas en Punto de Atención.

**SITIO DE ESTUDIO:** El Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatała Chabén "

#### **INVESTIGADORES PRINCIPALES:**

Cori Barfield, Co-Investigador Principal, PATH, Seattle, WA, EE.UU. Tel: 206-285-3500

Karenina Scollo, Co-Investigador Principal, Instituto Fatała, Buenos Aires, Argentina. Tel: 54-11-4331-2330.

### **FORMULARIO DE ASENTIMIENTO DEL NIÑO (PARA NIÑOS MAYORES DE 7 AÑOS)**

#### **Explicación básica de lo que es un estudio de investigación**

Un estudio de investigación es algo así como un proyecto de ciencias que realizas en la escuela. Las personas que dirigen el estudio quieren aprender algo nuevo. Ellos pueda que realicen observaciones de lo que está sucediendo a tu cuerpo y cuando el estudio se termine, ellos escribirán acerca de ello para educar a otras personas.

#### **¿Qué pasará en este estudio**

***En este estudio te vamos a tomar una pequeña cantidad de sangre de tu brazo y tu dedo. La sangre de tu brazo y el dedo ayudará a los médicos a realizar nuevas pruebas que ayuden a tratar a los niños que pueden enfermarse de ciertos gérmenes.***

#### **No tienes que participar en esta investigación si no lo deseas**

No tienes que hacer parte del estudio si no quieres. Si no quieres estar en el estudio, aunque dijiste que lo haría, todavía puedes cambiar de opinión.

Los responsables del estudio deben decirte lo que te va a pasar durante el

estudio. Puedes hacer preguntas sobre lo que tienes que hacer y estas preguntas deben ser respondidas.

Al firmar a continuación, estas aceptando que te han dicho de lo que se trata este estudio de investigación. La firma también indicas que entiendes lo que se te pide hacer y lo que puede suceder debido a que participes en este estudio.

La firma también indica que no se estás obligado a participar en el estudio si no se deseas participar.

---

Firma del niño (nombre es aceptable)

---

Fecha