

Artículo

ESTANDARIZACIÓN DE PAUTAS DE DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN VENEZUELA

STANDARDIZATION OF LABORATORY DIAGNOSTIC RULES FROM THE CHAGAS'S DISEASE

Dario, González¹
Mehudy, Medina¹
Marco P., Marruffo M.¹
Eva Mary, Rodríguez²
Jesús, Querales³

RESUMEN

La enfermedad de Chagas ha sido tema de interés en Venezuela desde principios del siglo XX, muchos investigadores han dirigido sus esfuerzos para desarrollar estudios en diversas áreas que han contribuido a la prevención y control. Los estudios seroepidemiológicos iniciados en la década de los años 60 han utilizado técnicas de diagnóstico de laboratorio en las cuales se ha tomado en cuenta su validez en términos de especificidad y sensibilidad. No obstante, para la confirmación de casos la OMS recomienda a los laboratorios la aplicación de al menos tres pruebas serológicas diferentes que hayan sido estandarizadas y validadas, considerando como positivos aquellos sueros en los que se han detectado anticuerpos en al menos dos de tres pruebas aplicadas. De allí surge la necesidad de establecer control de calidad de cada prueba para unificar criterios de estandarización y validez de resultados. En tal sentido, se realizó un estudio de validez y confiabilidad de resultados serológicos obtenidos en nueve laboratorios, utilizando paneles de sueros positivos y negativos para infección por *T. cruzi* con diferentes pruebas diagnósticas. Los resultados indican excelente confiabilidad entre las pruebas con un Kappa > 0,92 pero se recomienda en nuevos estudios incorporar aspectos relacionados con aleatorización, enmascaramiento y obtención de muestras en condiciones similares a la práctica clínica y estudios epidemiológicos de campo.

PALABRAS CLAVES: Diagnóstico de Laboratorio, Enfermedad de Chagas, Estandarización de Pruebas de Laboratorio, Pruebas Diagnósticas.

ABSTRACT

Chagas disease has been an interesting topic in Venezuela since the beginning of the XXth Century. Several researchers concentrated their efforts on the development of different areas which contributed to its prevention and control. Seroepidemiological studies, started during the 60's have used laboratory diagnostic techniques taking into account its validity in terms of specificity and sensibility. Nevertheless, for the purpose of case confirmation WHO's recommendation for laboratories states that three different serological tests, previously validated and standardized should be performed and only those sera in which antibodies have been detected in at least two of the samples can be considered as positives. Thus the need of setting up quality control of each test, as to unify criteria for standardization and validity of results. A research on reliability and validity of serological results obtained in nine laboratories was performed, using sera panels showing positive and negative answer to the infection by *T. cruzi*. Results obtained indicated excellent reliability among tests, with kappa > 0.92. Although, authors recommend the need of incorporating aspects related with randomization, concealing and sample collection in further studies performed in conditions as similar as possible with current clinical practice and epidemiological field studies.

KEY WORDS: Laboratory Diagnosis, Chagas Disease, Standardization Laboratory Tests, Diagnostic Tests.

¹Dirección de Salud Ambiental, Ministerio de Salud. ²Instituto de Biomedicina. ³Instituto de Higiene "Dr Rafael Rangel". Venezuela.
Correspondencia: mpmarruffo@yahoo.com

INTRODUCCIÓN

Desde las primeras décadas del siglo pasado, numerosos grupos de investigadores en nuestro país han mostrado gran interés y preocupación por el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, lo que ha generado múltiples estudios en diversas áreas como epidemiología, fisiopatología de la enfermedad, sociología, cardiología, y en inmunodiagnóstico.

En la década de los años sesenta se iniciaron los estudios seroepidemiológicos cuya aplicación fue ampliamente demostrada en numerosos trabajos que permitieron obtener resultados significativos en diferentes países, como Argentina, Chile, Uruguay y Venezuela para oficializar los programas de control y su impacto en la población. Inicialmente se utilizó la reacción de Fijación de Complementos (RFC) la cual fue evaluada por investigadores, que demostraron su alta sensibilidad, pero reconocieron su difícil ejecución; (1) más tarde son introducidas y utilizadas nuevas técnicas con igual sensibilidad y menor costo como la Hemaglutinación Indirecta (HAI) y ELISA (2).

Una seria limitación en el diagnóstico serológico se relaciona con la estandarización de las diferentes técnicas accesibles y la calidad de los antígenos usados para el inmunodiagnóstico. Al respecto Monteon y Col. (1995) en los laboratorios del Instituto Nacional de Cardiología y del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica, compararon sus pruebas de inmunofluorescencia indirecta, hemaglutinación y ensayo inmunoenzimático en la fase sólida (ELISA), con cepas de *T. cruzi* aisladas en México y encontraron una concordancia interlaboratorios de $Kappa=0,8$ y la sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos de las pruebas aseguraron resultados confiables en el inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas (3).

No obstante, para la confirmación de casos en estudios seroepidemiológicos, la Organización Mundial de la Salud recomienda solicitar a los Laboratorios al menos tres pruebas serológicas diferentes que hayan sido estandarizadas y validadas, igualmente que sean consideradas positivos aquellos sueros en los que se han detectado anticuerpos en al menos dos de las tres pruebas aplicadas (4).

En consecuencia, la necesidad de realizar control de calidad de cada prueba, en los diferentes laboratorios para unificar criterios de estandarización y

validez de los resultados, se ha mantenido como una preocupación entre investigadores y epidemiólogos.

En atención a ello, en el mes de abril del año 2000, se realizó en Sanare, estado Lara, el primer Consenso Nacional sobre de la enfermedad de Chagas en Venezuela, iniciativa de La Asociación Cardiovascular de Lara (ASCARDIO), la Universidad Centro Occidental "Lisandro Alvarado" y La Dirección de Salud Ambiental y Contraloría Sanitaria (Región VI) del Ministerio de Salud y Desarrollo Social (MSDS). Durante esta jornada, se establecieron mesas de trabajo donde se discutieron diversos aspectos de esta endemia, evidenciándose la necesidad de unificar criterios en lo referente al diagnóstico en esta enfermedad. Igualmente, se hizo patente el desarrollo notorio de técnicas de inmunodiagnóstico por distintos laboratorios de investigación y la utilización de las mismas en áreas geográficas específicas, como parte de sus actividades. Este hecho, ha contribuido a que más áreas del país hayan sido objeto de un intenso trabajo, que busca entre otros, conocer la situación epidemiológica de esta afección en esas zonas, dando mayor cobertura a la parte diagnóstica y permitiendo conocer la seroprevalencia de la infección por *T. cruzi*.

Sin embargo, en esta reunión se manifestó la divergencia existente entre los resultados de seroprevalencia que reportan diferentes instituciones, tanto de servicio como de investigación, tomando en cuenta las variaciones en cuanto a procedimientos técnicos, reactivos usados y criterios de referencia adoptados para determinar la sensibilidad y especificidad de las pruebas serológicas comúnmente usadas. A partir de esta inquietud se planteó la propuesta de realizar una evaluación exhaustiva de las diferentes pruebas diagnósticas que se utilizan en Venezuela, que permitiera medir el grado de comparabilidad entre estas pruebas diagnósticas, utilizadas por diversos centros y a su vez evaluar la validez de las mismas.

Con el objeto de dar viabilidad a dicha propuesta, la Dirección de Vigilancia Epidemiológica Sanitario Ambiental, Ministerio de Salud y Desarrollo Social (MSDS) conjuntamente con el Programa de Control de la enfermedad de Chagas, realizó en el año 2001, el **Taller Nacional de Estandarización de Pautas de Diagnóstico de la enfermedad de Chagas en Venezuela**, con sede en la ciudad de Maracay. Para ello, fueron invitadas diferentes instituciones y laboratorios relacionados con la investigación de esta enfermedad. En esta oportunidad se generó un plan de

trabajo tendiente a evaluar la validez y confiabilidad de las pruebas diagnósticas utilizadas en dichos laboratorios e instituciones. Esto con el fin de normalizar el diagnóstico serológico con la distribución de conjuntos idénticos de muestras de sueros con definición precisa de valores mínimos aceptables en cuanto a sensibilidad y especificidad en los laboratorio involucrados (5). El objetivo planteado fue, establecer lineamientos para la evaluación de la sensibilidad y especificidad de las diferentes pruebas diagnósticas utilizadas a nivel nacional por diversas instituciones en la enfermedad de Chagas, con el fin de diseñar un protocolo que permita valorar la comparabilidad de los resultados obtenidos mediante la aplicación de las diferentes pruebas y oriente sobre la situación actual de esta epidemia en el país.

EVALUACIÓN DE LAS PRUEBAS DIAGNOSTICAS

Para evaluar la validez y la confiabilidad entre los resultados serológicos de los diferentes laboratorios participantes, fueron usados paneles de sueros positivos y negativos para infección por *T. cruzi*, facilitados por el Instituto de Medicina Tropical de la Universidad Central de Venezuela (UCV) y el Laboratorio de Chagas de la Dirección de Vigilancia Epidemiológica Sanitario Ambiental del MSDS.

MUESTRA

El tamaño de la muestra estimada para la evaluación de las pruebas serológicas fue de 120 sueros, 60 positivos (confirmados parasitológicamente) y 60 negativos; tomando como patrón 80% de sensibilidad y especificidad y un nivel de confianza de 95%.

PANELES DE SUEROS

Se recolectaron muestras de suero de 120 personas infectadas y no infectadas de la práctica rutinaria de los laboratorios del Instituto de Medicina Tropical y el Laboratorio de Chagas, cuyo diagnóstico de laboratorio fue realizado por los mismos.

CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN SÉRICA

Las muestras de sueros fueron clasificadas como positivas si hubo confirmación parasitológica a través de métodos de visualización directa del parásito y negativas, cuando no hubo tal confirmación y tuvieron resultados negativos contra antígenos de *T. cruzi* en tres pruebas serológicas distintas, realizadas al mismo tiempo: IFI, HAI y ELISA.

ACONDICIONAMIENTO DE LOS PANELES DE SUEROS

Los sueros fueron reunidos en paneles de 120 muestras – positivas y negativas – con aproximadamente la mitad de cada grupo. Para eliminar los sesgos introducidos por la congelación y descongelación de los sueros, se prepararon en glicerol (50% suero y 50% glicerol). Fueron almacenadas y preservadas a temperatura de congelación, siendo codificadas y distribuidas a 9 laboratorios participantes, por el Instituto de Higiene “Rafael Rangel”. Fueron enviadas las instrucciones para el procesamiento y retorno de la información a ese centro, de los resultados obtenidos con las pruebas específicas de cada laboratorio. Para ocultar la identidad de cada laboratorio, a cada uno se les asignó un código numérico. La calidad de las muestras fue conservada adecuadamente, no constituyéndose en fuente de error para el diagnóstico.

TÉCNICAS DE LABORATORIO

Cada laboratorio participante, utilizó la o las pruebas diagnósticas que han desarrollado o que en forma rutinaria son usadas por los mismos. En la tabla 1 se resume las técnicas empleadas durante la evaluación.

A cada laboratorio le fue enviado un lote de 120 muestras para su respectivo procesamiento. Una vez procesadas dichas muestras, los laboratorios enviaron los resultados, mediante código, al Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”. Para la lectura de los códigos se fijó una fecha determinada.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para evaluar la validez de las pruebas se calculó la exactitud de las mismas a través de la proporción de muestras clasificadas en forma correcta. Igualmente se calculó la sensibilidad y especificidad relativa (co-positividad y co-sensibilidad) para determinar la capacidad de la prueba de detectar los sueros verdaderamente positivos y negativos respectivamente (4). Con el fin de cuantificar el nivel de confiabilidad (concordancia) en los resultados serológicos entre los laboratorios, se calculó la proporción de acuerdos debidamente corregida por la existencia de acuerdos al azar (Índice de *kappa*) con sus respectivos intervalos de confianza al 95% (6).

RESULTADOS

De nueve (9) laboratorios a los que les fueron enviados muestras para su procesamiento, solamente ocho (8) reportaron los resultados obtenidos para la

Tabla 1
Técnicas diagnósticas empleadas en la evaluación por cada laboratorio

| Laboratorio | Técnicas Empleadas | Observaciones |
|----------------------|---|--|
| Laboratorio 1 | ELISA comercial (UMELISA) | Marca SUMA, lote 010402 (fecha de exp. 12-2001) |
| Laboratorio 2 | Reacción de Hemoaglutinación Indirecta (HAI) Inmunofluorescencia indirecta (IFI) ELISA comercial (UMELISA) | Antígeno utilizado del Instituto de Medicina Tropical, Sección de Inmunología (1 ml del antígeno de <i>T. cruzi</i> por frasco. Lote II / 2001 CP.1,17 mg/ml (03-05-2001) Titulo 1/64 ELISA Marca SUMA, lote 010402 (fecha de exp. 12-2001) |
| Laboratorio 3 | ELISA no comercial | Antígeno Lote 1/2001 del Instituto de Medicina Tropical (IMT), Sección de Inmunología. |
| Laboratorio 4 | Técnica de Aglutinación Directa (TAD) | |
| Laboratorio 5 | ELISA | Antígeno: extracto de Epimastigotes de <i>T. cruzi</i> . |
| Laboratorio 6 | Hemoaglutinación Indirecta (HAI) | Técnica según Camargo y cols (1971). Antígeno: extracto proteico hidrosoluble exento de sustancias bencenosolubles (Maeckelt, 1964) adquirido en Sección de Inmunología del IMT-UCV. Lote II/2001. Título 1/64. |
| Laboratorio 7 | ELISA | Antígeno de <i>T. cruzi</i> cepa Y. |
| Laboratorio 8 | ELISA | Antígeno total de <i>T. cruzi</i> 10 ug/ml |

Tabla 2
Clasificación de los resultados serológicos reportados por los laboratorios
de acuerdo a estándar de referencia

| Laboratorios | Resultados Serológicos | | | | | | | |
|--------------|------------------------|----------|----------|-------|----|----|----|----|
| | Positivo | Negativo | Sin Res. | Total | VP | VN | FP | FN |
| Lab 1 | 58 | 59 | 3 | 120 | 57 | 59 | 1 | 0 |
| Lab 2 | 58 | 62 | 0 | 120 | 58 | 62 | 0 | 0 |
| Lab 3 | 58 | 62 | 0 | 120 | 58 | 62 | 0 | 0 |
| Lab 4 | 57 | 62 | 1 | 120 | 57 | 60 | 0 | 2 |
| Lab 5 | 58 | 62 | 0 | 120 | 58 | 62 | 0 | 0 |
| Lab 6 | 57 | 63 | 0 | 120 | 57 | 63 | 0 | 0 |
| Lab 7 | 59 | 61 | 0 | 120 | 59 | 60 | 0 | 1 |
| Lab 8 | 58 | 62 | 0 | 120 | 57 | 61 | 1 | 1 |

VP: Verdaderos positivos, VN: Verdaderos negativos, FP: Falsos positivos, FN: Falsos negativos

*Todos los sueros tenían diagnóstico parasitológico

Tabla 3
Medidas de validez de las pruebas diagnósticas utilizadas
por los laboratorios participantes

| Laboratorios | Validez de las Pruebas Diagnósticas | | |
|--------------|-------------------------------------|----------------|----------------|
| | Exactitud | Co-positividad | Co-negatividad |
| Lab 1 | 99,15% | 100% | 98,3% |
| Lab 2 | 100,00% | 100% | 100% |
| Lab 3 | 100,00% | 100% | 100% |
| Lab 4 | 98,32% | 96,6% | 100% |
| Lab 5 | 100,00% | 100% | 100% |
| Lab 6 | 100,00% | 100% | 100% |
| Lab 7 | 99,17% | 98,3% | 100% |
| Lab 8 | 98,33% | 98,3% | 98,4% |

Tabla 4
Confiabilidad del diagnóstico serológico de infección por
***T. cruzi* entre los laboratorios participantes.**

| | Lab 1 | Lab 2 | Lab 3 | Lab 4 | Lab 5 | Lab 6 | Lab 7 | Lab 8 |
|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Lab 1 | | 0.9826 | 0.9824 | 0.9224 | 0.9810 | 0.9823 | 0.9643 | 0.9468 |
| Lab 2 | | | 1.0000 | 0.9439 | 1.0000 | 1.0000 | 0.9829 | 0.9661 |
| Lab 3 | | | | 0.9434 | 1.0000 | 1.0000 | 0.9827 | 0.9658 |
| Lab 4 | | | | | 0.9443 | 0.9428 | 0.9423 | 0.9247 |
| Lab 5 | | | | | | 1.0000 | 1.0000 | 0.9631 |
| Lab 6 | | | | | | | 0.9826 | 0.9655 |
| Lab 7 | | | | | | | | 0.9478 |
| Lab 8 | | | | | | | | |

fecha de apertura de códigos. Los resultados están resumidos en la tabla 2.

Los laboratorios 1 y 4, no reportaron todos los resultados de las muestras enviadas. La proporción de falsos positivos fue de 0,85% para los laboratorios 1 y 8. Por otra parte a la proporción de falsos negativos fue de 0,83% para los laboratorios 7 y 8, y de 1,68% para el laboratorio 4.

De acuerdo a los datos de la tabla 3, todos los laboratorios clasificaron en forma correcta, por encima del 98% de los sueros estudiados. En cuanto a la co-positividad y la co-negatividad de las pruebas, todos presentaron cifras mayores a 98%, excepto para el laboratorio 4 con 96,6% de co-positividad.

Con respecto a la confiabilidad entre los laboratorios, en la tabla 4, se aprecia que la concordancia del diagnóstico serológico para infección por *T. cruzi*, entre los distintos métodos diagnóstico empleados, fue muy buena, ya que todos superaron el 92% cuando son corregidos por los acuerdos esperados por azar ($kappa > 0.92$).

Los resultados de concordancia más bajos se observan con el laboratorio 4, sin embargo, todos son mayores a 0,92. Es conveniente resaltar, que los

laboratorios 2, 3 y 6, utilizaron los mismos antígenos (Sección de Inmunología, del Instituto de Medicina Tropical), y entre los mismos se obtuvo concordancia perfecta ($kappa=1,00$). Estos resultados indican que las pruebas diagnósticas utilizadas, tienen una validez y una confiabilidad interprueba excelente.

Conforme a lo acordado durante la primera jornada de trabajo, se realizó una segunda reunión, donde se presentaron los resultados obtenidos de la evaluación de las pruebas diagnósticas, En esta jornada, surgieron nuevos acuerdos, entre los cuales cabe destacar:

Evaluar la especificidad de las técnicas de diagnóstico, utilizando sueros de pacientes con otras parasitosis, como por ejemplo: Leishmaniosis, Lepra, etc

Definir las condiciones de trabajo básico (protocolo experimental) de cada técnica evaluada y luego valorar la reproducibilidad de las diferentes técnicas entre distintos laboratorios (diferentes manos y condiciones).

Incorporar a otros laboratorios que hacen diagnóstico de la enfermedad de Chagas en las próximas reuniones (Laboratorio de la Universidad de Oriente, Laboratorio de Salud Pública del estado Guárico y otros).

Una vez determinada la(s) técnica de referencia se deben evaluar los Kits comerciales de diagnóstico de la enfermedad de Chagas, para estandarizarlos y poder recomendarlos para su uso.

Definir un protocolo de reproducibilidad y evaluación de la especificidad.

CONCLUSIONES GENERALES

Todas las pruebas empleadas por los laboratorios participantes en la evaluación, tuvieron una validez por encima del 96%. Los resultados descritos indican diferencias muy pequeñas entre los laboratorios en cuanto a sensibilidad relativa (co-positividad), con un rango de 3,4% (96,6% - 100%), siendo de 100% en cinco de los ocho laboratorios. Esto revela que en las condiciones en que se realizó esta evaluación, las distintas pruebas tienen una excelente capacidad para detectar los sueros verdaderamente positivos. En cuanto a la especificidad relativa, los resultados fueron superiores, en el sentido que la co-negatividad más baja fue de 98,3% y seis de los ocho laboratorios tuvieron valores de 100%.

Los resultados descritos para la concordancia entre los diagnósticos de los distintos laboratorios, indican una excelente confiabilidad entre pruebas ($kappa > 0.92$).

Es importante resaltar, que 6 de los 8 laboratorios participantes, utilizaron una sola prueba diagnóstica. Este hecho, hace muy prometedor su utilización en estudios epidemiológicos, puesto que en ellos, se requiere de pruebas sensibles, sencillas de utilizar y de bajo costo, lo que reduciría la complejidad del procesamiento de numerosas muestras.

El presente estudio se realizó con el material disponible, es decir, sueros previamente colectados. Esta metodología, inevitablemente introduce el riesgo de sesgo, ya que ¿quiénes son los pacientes a quienes se les guardó muestra en un banco de suero? o ¿cuál fue la razón por la que se realizó la prueba en primer lugar?. En muchas ocasiones, las muestras se toman por razones clínicas, y las características de estos pacientes difieren en mucho a las de la población general. A pesar de ello, esta metodología permite evaluar la confiabilidad de las pruebas y abre camino a otros estudios en campo, con la incorporación de otros laboratorios del país.

Los parámetros ideales para la evaluación de una prueba serológica son la sensibilidad y especificidad, los cuales pueden ser establecidos cuando el método de diagnóstico de referencia es el diagnóstico verdadero de infección. Sin embargo, este no es el caso de la enfermedad de Chagas, debido a la ocurrencia de falsos negativos, tanto por xenodiagnóstico, hemocultivo o por otros métodos de demostración directa del *T. cruzi*. Esto debe ser tomado en cuenta, ya que a mediano plazo, es recomendable realizar un estudio tendiente a determinar la validez de las pruebas diagnósticas y su utilidad a nivel de la población, incorporando los aspectos relacionados con la aleatorización, enmascaramiento y obtención de las muestras en las mismas condiciones que en la práctica clínica y en los estudios epidemiológicos de campo.

AGRADECIMIENTO

Se agradece a los representantes de las Instituciones participantes, por su asistencia y colaboración y en especial a la representación de la Oficina Sanitaria Panamericana en Venezuela y al TDR/OMS por su apoyo financiero y asesoría técnica.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- (1) Sosa - Estani, S. (2001). La seroepidemiología en la Investigación de la infección con *T. cruzi*. Grupo de trabajo OPS en enfermedad de chagas. Montevideo, Uruguay.
- (2) Hubsch, R; Chiechi, N., Núñez, V. (1979) La Reacción de Hemaglutinación Indirecta (RHI) en Estudios Seroepidemiológicos sobre la enfermedad de Chagas. Bol.Dir. Malariol. y San. Ambiental. 34: 129-142.
- (3) Monteon, V; Guzman Bracho C.; Floriani - Verdugo J., Ramos Evheverria, A., y Col. (1995). Diagnóstico serológico de la enfermedad de chagas: autosuficiencia y concordancia interlaboratorios. Revista Salud Pública de México Mayo - Junio. Vol 37 N° 3 pp. 232 - 235
- (4) Organización Mundial de la Salud (OMS) (1991). Control de la enfermedad de Chagas. Comité de Expertos. Serie de Informes Técnicos N° 811. Ginebra 1-95.
- (5) Camargo M, Segura, E., Kagun I, y Col (1998). Quality assurance of the serologic diagnosis of Chagas' disease. Pan. Am. J. Public Health 3(4): 242-247.
- (6) Bangdiwala, S. y Muñoz, S. (1997). Medición de Confiabilidad y Validez en instrumentos clínicos. Rev. Med. Chile; 125: 466-473.

Recibido: Julio 2005
Aprobado: Octubre 2005