

PREVALENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-*TRYPANOSOMA CRUZI* EN DONANTES DE SANGRE

JORGELINA L. BLEJER, MARIA C. SAGUIER, ROXANA A. DINAPOLI, HORACIO J. SALAMONE

División Medicina Transfusional y Departamento de Investigaciones Clínicas, Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular, Fundación Favaloro, Buenos Aires

Resumen La transmisión de la enfermedad de Chagas por vía transfusional es la segunda causa en importancia de infección en áreas endémicas. Existen discrepancias en los resultados obtenidos con los equipos disponibles para el estudio de la presencia de marcadores serológicos anti-*Trypanosoma cruzi*. El objetivo del presente trabajo fue determinar la seroprevalencia de marcadores anti-*T. cruzi*, comparar la sensibilidad y especificidad relativas de las dos técnicas de tamizaje que utilizamos en nuestra División y confirmar los resultados con un tercer ensayo. Se estudiaron un total de 20 860 donantes voluntarios por hemoaglutinación indirecta (HAI) y enzimoimmunoensayo (EIE). Las muestras repetidamente reactivas fueron ensayadas por un EIE llevado a cabo en tiras de nitrocelulosa (DB). Los sueros que resultaron reactivos en al menos dos de las pruebas se consideraron positivos. La prevalencia de marcadores anti-*T. cruzi*, fue de 2.76% (576 muestras). De todas las muestras estudiadas, el 1.87% fueron confirmadas positivas. No se registraron falsos negativos para la prueba de EIE, mientras que 98 muestras (0.47%) fueron falsos negativos para el HAI. La especificidad relativa fue del 99.3% y 99.8% para EIE y HAI respectivamente. En nuestro caso, el descarte de unidades falsamente reactivas corresponde a casi el 0.9% del total de donaciones, de las cuales dos tercios corresponden a falsos EIE y un tercio a falsos HAI. Es importante destacar que en la población estudiada no se han registrado falsos negativos para EIE pero sí para HAI, lo que indicaría, que a pesar de que el primer método es menos específico, resulta mucho más sensible. Resulta de importancia la confirmación de los resultados obtenidos en las pruebas tamiz para evitar el aviso innecesario a los donantes falsamente reactivos y permitir eventualmente futuras donaciones. El DB empleado en el presente estudio resulta una alternativa útil para este propósito.

Abstract *Prevalence of anti-Trypanosoma cruzi antibodies in blood donors.* Blood transfusion is the second most common transmission route of Chagas' disease in endemic areas. Discrepancies between the available diagnostic kits are common, which indicates that a single test is not satisfactory. The aim of this work was to study the seroprevalence of anti-*Trypanosoma cruzi* markers, to compare sensitivity and specificity of the two screening assays currently in use and to confirm the results with a third test. A total of 20 860 volunteer blood donors were studied. Donations were screened with indirect hemagglutination assay (IHA) and enzyme immunoassay (EIA). Repeatedly reactive samples were assayed with an EIA carried out on strips, to which a mixture of *T. cruzi* antigens was applied as an horizontal line (DB). Sera that reacted in at least two tests were considered positive. A total of 576 samples were reactive for one or both screening tests (2.76%) and 391 of them (1.87%) were confirmed positive. EIA proved to be more sensitive, with no false negative results (100% sensibility), whereas 98 samples (0.47%) were IHA false negative (74.93% sensibility). Specificity for EIA was 99.3% and for IHA 99.8%. In our case, almost 0.9% of donated blood is discarded because of false reactive anti-*T. cruzi* results; two thirds correspond to false positive EIA and one third to false positive IHA. It is important to note that in our population we have not registered false negative results for EIA but there were false negative IHA. This fact implies that although the first method is less specific, it is much more sensitive. It is important to confirm the screening results in order to avoid unnecessary donor counselling and permit future donations. The DB test employed in our study results a useful alternative for this purpose.

Key words: Chagas' disease, blood donors, screening assays

La enfermedad de Chagas es endémica en toda América Latina. Su agente, el *Trypanosoma cruzi*, es transmitido principalmente por un triatómido, el que puede producir una enfermedad aguda, la cual resuelve natu-

ralmente, y el huésped infectado permanece asintomático durante décadas hasta detectarse las manifestaciones crónicas¹. La transfusión sanguínea es la segunda causa de transmisión en áreas endémicas^{2,3}, siendo el riesgo de infección por esta vía del 12 al 15% por unidad contaminada transfundida⁴. Por lo tanto, es un desafío para los Bancos de Sangre identificar y excluir a los portadores crónicos asintomáticos.

Los métodos para diagnosticar la enfermedad crónica se basan en la detección de anticuerpos contra el

Recibido: 26-V-1998

Aceptado: 23-XII-1998

Dirección postal: Dra. Jorgelina L. Blejer, División Medicina Transfusional, Fundación Favaloro, Av. Belgrano 1746, 1093 Buenos Aires, Argentina
Fax: (54-11) 4381-1001; E-mail: medtrans@affinne.edu.ar

parásito ya que los métodos parasitológicos tienen una sensibilidad del 30 al 50%⁵. Por otra parte, en Argentina es obligatorio que todas las donaciones de sangre sean estudiadas al menos por dos técnicas serológicas ya que ninguna de ellas es lo suficientemente sensible⁶.

Los ensayos empleados en el tamizaje no son suficientemente específicos⁷ debido a que las preparaciones de antígenos utilizadas son derivados de extractos de parásitos que contienen epitopes que reaccionan con anticuerpos hacia otras infecciones⁸. Es por esta razón, que se recomienda el uso de al menos dos métodos para el diagnóstico de la enfermedad⁷.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la prevalencia de marcadores anti-*T. cruzi* en nuestra población de donantes, comparar la sensibilidad y especificidad relativas de las dos técnicas de tamizaje que utilizamos en nuestra División y confirmar los resultados con un tercer ensayo.

Materiales y métodos

Muestras

Se estudió un total de 20 860 muestras pertenecientes a donantes de sangre voluntarios consecutivos en el período comprendido entre el 10 de enero de 1997 y el 30 de marzo de 1998.

Pruebas serológicas

Se utilizaron los siguientes equipos comerciales: hemoaglutinación indirecta (HAI) (Polychaco, Argentina) y enzimoimmuno-ensayo (EIE) (Chagatek, sistema microelisa, Organon Teknika, Argentina). Cada ensayo fue realizado de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. Las 20 860 muestras fueron ensayadas por ambas técnicas simultáneamente (HAI y EIE).

Todas las muestras inicialmente reactivas fueron repetidas por duplicado y las repetidamente reactivas (576 muestras) se estudiaron con un EIE que utiliza antígenos recombinantes y es llevado a cabo en forma de "dot blot" (DB) (Dia Kit Bio Chagas, Gador, Argentina)⁹.

Los sueros que reaccionaron en al menos dos de las tres pruebas se consideraron positivos y cuando lo hicieron en sólo una de las pruebas, falsos positivos.

Fueron consideradas verdaderas positivas a las muestras con al menos dos pruebas reactivas; falsas negativas para una prueba a las muestras negativas en esa prueba evaluada y reactivas en las otras dos, y falsas positivas a las muestras reactivas solamente en la prueba evaluada y negativas en las dos restantes.

De acuerdo a esto se calculó la sensibilidad relativa de una técnica dividiendo el número de verdaderos positivos sobre la suma de verdaderos positivos más falsos negativos por cien, y a la especificidad relativa de una prueba dividiendo el número de verdaderos negativos sobre la suma de verdaderos negativos más falsos positivos por cien.

Análisis estadístico

Se calculó el promedio, error estándar (ES) e intervalo de confianza (IC) al 95%.

Resultados

De las 20 860 muestras estudiadas, 576 fueron reactivas por uno o dos de los métodos de screening (2.76%, ES: 0.1135, IC: 2.9924-2.5475, $p < 0.05$). Según se observa en la Tabla 1, se distinguen 6 grupos con patrones de respuesta diferentes.

Trescientas noventa y una muestras (1.8%, ES: 0.939, IC: 2.0675-1.6991, $p < 0.05$) fueron reactivas en –por lo menos– 2 de 3 ensayos, y por lo tanto se consideraron confirmadas positivas; 17 (0.08%) correspondieron al Grupo III (EIE y HAI reactivos), 98 (0.47%) al Grupo IV (EIE y DB reactivos) y 276 (1.32%) al Grupo VI (EIE, HAI y DB reactivos).

Es de hacer notar que 134 de 142 muestras (94.37%) en el Grupo I (EIE reactivos; falsos reactivos) tuvieron una relación de positividad (RP) (valor de absorbancia de la muestra/valor de corte) < 2 ; al igual que 12 de 17 muestras (70.59%) en el Grupo III (EIE y HAI reactivos; falsos negativos para DB) y 72 de 98 muestras (73.47%) en el Grupo IV (EIE y DB reactivos; falsos negativos para HAI). Por otra parte, en el Grupo VI (los tres ensayos reactivos), sólo 31 de 276 muestras (11.23%) presentaron una RP para EIE < 2 .

Como se observa en la Tabla 2, la técnica de EIE no presentó falsos negativos en la población estudiada (100% de sensibilidad relativa), mientras que 98 muestras confirmadas positivas por los otros dos métodos fueron negativas por el método de HAI (74.93% de sensibilidad relativa). En cuanto a la especificidad relativa de ambas pruebas de tamizaje, fue de 99.3% y 99.8% para EIE y HAI respectivamente ya que presentaron un 0.68% y 0.21% de resultados falsos positivos, lo que da lugar, con este nivel de prevalencia, a un valor predictivo positivo (VPP) para EIE del 73.35% y para HAI del 87.2%.

TABLA 1.– Anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi*: sueros reactivos en cada prueba o en combinaciones de pruebas en 20 860 donantes de sangre

Grupo	Prueba o combinación de pruebas	n	%	RP<2	
				n	%
I	EIE	142	0.68	134	94.37
II	HAI	43	0.21		
III	EIE+HAI	17	0.08	12	70.59
IV	EIE+DB	98	0.47	72	73.47
V	HAI+DB	0	0.00		
VI	EIE+HAI+DB	276	1.32	31	11.23

RP: relación de positividad (valor de absorbancia de la muestra sobre el valor de corte)

EIE: Enzimoimmunoensayo; HAI: hemoaglutinación indirecta, DB: "dot blot"

TABLA 2.— Sensibilidad y especificidad relativas de las pruebas de tamizaje empleadas para detección de anti-T. cruzi

Reactivos	Confirmados positivos*	Falsos negativos**	Falsos positivos***	Sensibilidad %	Especific. %
EIE 533	391	0	142	100.00	99.3
HAI 336	293	98	43	74.93	99.8

* Al menos dos de tres pruebas reactivas.

** Muestras negativas en la prueba evaluada y reactivas en las otras dos.

*** Muestras reactivas solamente en la prueba evaluada y negativas en las dos restantes.

Discusión

Cuando se evalúan la sensibilidad y especificidad de las pruebas comerciales para detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* con sueros reactivos o negativos bien caracterizados, éstas resultan satisfactorias, pero cuando se usan combinaciones de diferentes métodos en estudios epidemiológicos o en Bancos de Sangre, frecuentemente existen discrepancias^{6, 7}.

Diversos trabajos describen la seroprevalencia de anti-*T. cruzi* en Bancos de Sangre de Argentina y otros países de Latinoamérica, en áreas urbanas y rurales^{2, 10}. La infección con este parásito ha sido asociada con niveles socioeconómicos bajos y viviendas precarias, especialmente en áreas rurales, pero debido a la migración desde esas regiones a las grandes ciudades, cada vez hay mayor número de personas infectadas que residen en áreas urbanas. Por lo tanto, la prevalencia en cada Banco de Sangre depende de su ubicación (urbana o rural) y además, de la rigurosidad del cuestionario y la anamnesis del potencial donante.

En Argentina, el control de la transmisión de la infección chagásica por transfusión es llevado a cabo por el INDIECH (Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la enfermedad de Chagas "Dr. Mario Fatala Chabén"). El mismo realizó en 1987 una encuesta nacional de todas las instituciones que se ocupan de transfusiones de sangre. A la misma respondieron 423 centros (60%), de los cuales la mitad efectuaba una única reacción. En la provincia de Buenos Aires, el valor obtenido fue de 4.89% y en las provincias con alta endemidad como Jujuy, Chaco, Santiago del Estero y la Rioja, del 17.5, 23.9, 17.6 y 19.3% respectivamente¹¹.

Una revisión realizada por Schmuñis² señala una prevalencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* en donantes de sangre del 1.7% para la ciudad de Buenos Aires sobre 12 991 muestras, cifra que coincide con nuestros datos. En cuanto al interior del país, la provincia de Buenos Aires presentó una prevalencia del 4.9% y en Chaco, Santiago del Estero y La Rioja del 23.9, 17.6 y 20.4% respectivamente.

Pérez Bianco y Santarelli¹² recolectaron información de 49 Bancos de Sangre desde 1987 a 1992. Para detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* se utilizaron diferentes técnicas, siendo la más utilizada la prueba de HAI. La seroprevalencia en los diferentes años fue similar. De 1 047 024 donaciones, los mayores porcentajes de positividad se observaron en las provincias de La Rioja (11.1%), San Juan (11.6%), Mendoza (10.4%), Catamarca (8.3%), Córdoba (6.5%) y Corrientes (6.8%) y del total fue reactivo el 4.4%. Un porcentaje similar (4.4%) fue informado para el año 1997 sobre un total de 742 330 donantes en la VII Reunión de la Comisión Intergubernamental para la eliminación de *Triatoma infestans* y la interrupción de la transmisión de la tripanosomiasis americana por transfusión.

La prevalencia de marcadores anti-*T. cruzi*, en nuestra División fue de 2.76%. De todas las muestras estudiadas (20 860), 1.32% fueron reactivas para los tres métodos, 0.55% para dos y un elevado porcentaje (0.89%) fue reactivo para uno. Por lo tanto, la seroprevalencia confirmada fue del 1.87% (al menos dos pruebas reactivas).

En otras instituciones como el Instituto de Hemoterapia de La Plata¹³ en 13 601 donantes y el Hospital Fernández de la ciudad de Buenos Aires¹⁴ en 4 914 donantes, utilizando como par serológico HAI y EIE y como tercera técnica inmunofluorescencia indirecta, obtuvieron una prevalencia inicial del 3.8 y 7.7% respectivamente y confirmados positivos el 1.6 y 4.8%.

La utilización de los métodos de tamizaje existentes para la búsqueda de marcadores de *T. cruzi* en los Bancos de Sangre representa un alto costo por el importante descarte de unidades falsas reactivas que ocurre debido a la reactividad cruzada con otros antígenos^{7, 15}. Un estudio reciente realizado en Brasil sugiere que sólo una de cinco unidades positivas para *T. cruzi* puede considerarse confirmada positiva¹⁶; en nuestro caso, corresponde a casi el 0.9% del total de donaciones de las cuales dos tercios corresponden a falsos EIE y un tercio a falsos HAI. Es importante destacar que en la población estudiada no se han registrado falsos negativos para EIE pero

sí para HAI (74.9% de sensibilidad relativa), lo que indicaría, que a pesar de que el primer método es menos específico y presenta un valor predictivo positivo menor, resulta mucho más sensible.

Resulta de importancia la confirmación de los resultados obtenidos en las pruebas "tamiz" para evitar el aviso innecesario y permitir la reentrada de los donantes. Se han descrito varias técnicas sensibles y específicas como el RIPA, PCR, quimioluminiscencia, etc.¹⁷⁻¹⁹ que resultan complicadas para realizar en Bancos de Sangre pero son útiles para confirmar casos discordantes o dudosos. El DB empleado en el presente estudio resulta una alternativa útil para este propósito.

Bibliografía

- Rigou DG, Carnevalli L. Enfermedad de Chagas en dañados de sangre. *Medicina (Buenos Aires)* 1997; 57: 693-8.
- Schmuñis GA. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and non-endemic countries. *Transfusion* 1991; 31: 547-57.
- Wendel S, Gonzaga AL. Chagas' disease and blood transfusion: A new world problem? *Vox Sang* 1993; 64: 1-12.
- Wendel S. Current concepts on the transmission of bacteria and parasites by blood components. *São Paulo Med J* 1995; 113: 1036-52.
- Kirchhoff LV. Chagas' disease: American trypanosomiasis. *Infect Dis Clin NA* 1993; 7: 487-502.
- Salles NA, Sabino EC, Cliquet MG, Eluf-Neto J, Mayer A, Almeida-Neto C, et al. Risk of exposure to Chagas' disease among seroreactive Brazilian blood donors. *Transfusion* 1996; 36: 969-73.
- Carvalho MR, Krieger MA, Almeida E, Oelemann W, Shikanai-Yassuda MA, Ferreira AW, et al. Chagas' disease diagnosis: evaluation of several tests in blood bank screening. *Transfusion* 1993; 10: 830-4.
- Godsel LM, Tibbetts RS, Olson CL, Chaudoir BM, Engman DM. Utility of recombinant flagellar calcium-binding protein for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *J Clin Microbiol* 1995; 8: 2082-5.
- Pastini AC, Iglesias SR, Carricarte VC, Guerin ME, Sánchez DO, Frasch ACI. Immunoassay with recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens potentially useful for screening donated blood and diagnosing Chagas' Disease. *Clin Chem* 1994; 40: 1893-7.
- Knecher LM, Rojkin LF, Capriotti GA, Lorenzo LE. Chagas' disease screening in blood bank employing enzyme immunoassay. *Int J Parasitol* 1994; 24: 207-11.
- Pérez A, Segura E. Transfusión de sangre y transmisión de la infección chagásica en Argentina. *Rev Arg Transf* 1989; 15: 127-32.
- Pérez Bianco R, Santarelli MT. Análisis de un relevamiento serológico para enfermedades transmisibles por transfusión de sangre a nivel nacional. *Rev Arg Transf* 1994; 20: 73-82.
- Fontana DG, Fernández MH. Análisis de la incidencia de la enfermedad de Chagas en los donantes de sangre del Instituto de Hemoterapia de la Provincia de Buenos Aires - Período 9/94-2/95. *Rev Arg Transf* 1995; 21: 257-8.
- Carnevalli L, Cattáneo C. Detección de infección chagásica en Bancos de Sangre. *Rev Arg Transf* 1997; 23: 24-5.
- Kerndt PR, Waskin HA, Kirchhoff LV, Steurer F, Waterman SH, Nelson JM, et al. Prevalence of antibody to *Trypanosoma cruzi* among blood donors in Los Angeles, California. *Transfusion* 1991; 31: 814-8.
- Hamerschlack N, Pasternak J, Amado-Neto V, Carvalho MB, Guerra CS, Coscina AL, et al. Chagas' disease, an algorithm for donor screening and positive donor counseling. *Rev Soc Bras Med Trop* 1997; 30: 205-9.
- Almeida JC, Covas DT, Soussumi LMT, Travassos LR. A highly sensitive and specific chemiluminescence enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of active *Trypanosoma cruzi* infection. *Transfusion* 1997; 37: 850-7.
- Winkler MA, Brashear RJ, Hall HJ, Schur JD, Pan AA. Detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* among blood donors in the southwestern and western United States. II. Evaluation of a supplemental enzyme immunoassay and radioimmunoassay for confirmation of seroreactivity. *Transfusion* 1996; 35: 219-25.
- Umezawa ES, Nascimento MS, Kesper Jr. N, Coura JR, Borges-Pereira J, Junqueira ACV, et al. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2143-7.

La ciencia sólo puede vivir en estas tres libertades: libertad de buscar la verdad, libertad de exponerla y libertad de examinarla.

Bernardo A. Houssay (1887-1971)

La investigación científica, Buenos Aires: Editorial Columba, 1955