

# NORMALIZACION DEL DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN LAS AMERICAS: EVALUACION DE TRES AÑOS DE COLABORACION<sup>1</sup>

Mario E. Camargo,<sup>2</sup> Elsa L. Segura,<sup>3</sup> Irving G. Kagan,<sup>4</sup>  
José Maria Pacheco Souza,<sup>5</sup> José da Rocha Carvalheiro,<sup>6</sup>  
Jorge F. Yanovsky<sup>7</sup> y Maria Carolina S. Guimarães<sup>2</sup>

## INTRODUCCION

La disparidad de los diagnósticos serológicos de la enfermedad de Chagas efectuados por distintos laboratorios es un problema frecuente. De hecho, teniendo en cuenta las variaciones en cuanto a procedimientos técnicos y reactivos usados y a los criterios para evaluar los resultados de las pruebas serológicas, no son realmente inesperadas las discrepancias

entre los resultados obtenidos por laboratorios diferentes. En consecuencia, en 1981 se inició un estudio en colaboración con el fin de establecer un programa continental de normalización del diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas, auspiciado por el Programa Especial PNUD/Banco Mundial/OMS de Investigaciones y Enseñanzas sobre Enfermedades Tropicales.

En este informe se esboza la situación del estudio y la labor realizada hasta fines de octubre de 1983, se presentan algunos datos estadísticos y se describen los resultados obtenidos. También se comenta la experiencia adquirida y se hace una serie de propuestas sobre medidas futuras.

<sup>1</sup> Se publica en inglés en el *Bulletin of the Pan American Health Organization* Vol. 20, No. 3, 1986. Esta investigación recibió apoyo económico del Programa Especial PNUD/Banco Mundial/OMS de Investigaciones y Enseñanzas sobre Enfermedades Tropicales.

<sup>2</sup> Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Laboratorio de Inmunología y Seroepidemiología. Dirección postal: Av. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar 470, São Paulo, 05403 São Paulo, Brasil.

<sup>3</sup> Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la Enfermedad de Chagas "Dr. Mario Fatala Chabén", Buenos Aires, Argentina.

<sup>4</sup> Centros para el Control de Enfermedades, Centro de Enfermedades Infecciosas, División de Parasitosis, Atlanta, Georgia, EUA.

<sup>5</sup> Universidad de São Paulo, Facultad de Salud Pública, Departamento de Epidemiología, São Paulo.

<sup>6</sup> Universidad de São Paulo, Facultad de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Medicina Social y Preventiva, Ribeirão Preto, São Paulo.

<sup>7</sup> Fundación Polychaco, Buenos Aires.

# MATERIALES Y METODOS

## Preparación de las muestras de suero

Con el fin de comparar técnicas de diagnóstico, los laboratorios participantes intercambiaron conjuntos de muestras. Se estableció un procedimiento práctico de bajo costo para eliminar la costosa tarifa postal aérea del envío de sueros congelados o la utilización de muestras liofilizadas. El procedimiento consistía en conservar el suero mezclándolo con un volumen igual de glicerina de grado analítico, una técnica muy conveniente para mantener inalteradas las titulaciones séricas durante años de almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$ , o durante semanas o meses de almacenamiento a la temperatura ambiente.

Como pequeñas cantidades de suero bastan para efectuar una serie de pruebas, se distribuyeron cantidades alícuotas (200 a 300  $\mu\text{l}$ ) de muestras conservadas en glicerina en segmentos de 4-5 cm de tubo plástico de unos 3 mm de diámetro, fabricado por Eletrovet (Eletro Veterinária Limitada, São Paulo, Brasil). Se sellaron estas "pajillas" introduciendo en ambos extremos esferitas de poliestireno (Araguaia Indústria e Comércio Limitada, São Paulo, Brasil). Se podían entonces enviar sobres comunes con 100 ó 200 "pajillas" por correo aéreo.

Descubrimos que eran necesarias dos bolitas en cada extremo de la pajilla para evitar filtraciones; además, se

encontró que, para conservar el suero, era mejor la glicerina recién destilada, ya que, aparentemente, la glicerina almacenada durante mucho tiempo puede contener sustancias de descomposición que a la larga pueden provocar una disminución de la reactividad del suero. Para proteger las pajillas de presiones excesivas durante el envío se las colocó en ranuras adecuadamente profundas de una hoja de cartón corrugado, cubierta con una plancha de cartón rígido.

## Estudios comparativos en tres laboratorios

Durante una reunión de trabajo sobre serología de la enfermedad de Chagas auspiciado por el Programa Especial PNUD/Banco Mundial/OMS de Investigaciones y Enseñanzas sobre Enfermedades Tropicales, que se efectuó en julio de 1980 en São Paulo, Brasil, se constituyó un grupo llamado Grupo Continental para Estudios sobre Serología de la Enfermedad de Chagas, integrado por representantes de nueve países. Este grupo estableció las bases para iniciar estudios comparativos en tres laboratorios—uno en la Argentina,<sup>9</sup> otro en el Brasil<sup>10</sup> y el tercero en los Estados Unidos de América<sup>11</sup>— como medida preliminar para realizar un estudio amplio con la participación de laboratorios de otros países.

Estos tres laboratorios llevaron a cabo dos estudios comparativos. En ambos, cada laboratorio examinó dos series (A y B) de muestras de suero; la serie A fue proporcionada por la Argentina y la B, por el Brasil. Cada una incluía 150 muestras de suero; las de la serie A fueron tomadas de sujetos sin historias

<sup>9</sup> Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la Enfermedad de Chagas "Dr. Mario Fátala Chabén".

<sup>10</sup> Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

<sup>11</sup> Centros para el Control de Enfermedades, Centro de Enfermedades Infecciosas, División de Parasitosis.

clínicas, mientras que las de la serie B correspondían a dos grupos de personas, unas con infección por *Trypanosoma cruzi* y las otras residentes con altos ingresos de una zona exenta de la enfermedad, que se presumía que no sufrían infección por *T. cruzi*, pero que probablemente no eran representativos de la población que vive en zonas donde es endémica la enfermedad de Chagas. En el primero de los dos estudios comparativos se emplearon los procedimientos de pruebas serológicas usados ordinariamente en cada uno de los tres laboratorios, mientras que en el segundo, se usaron protocolos uniformes para cada prueba y el mismo reactivo comercial.

Después de estos dos estudios, se unieron a los tres laboratorios participantes otros cuatro laboratorios de Bolivia, Colombia, Chile y Panamá, para realizar un tercer estudio.<sup>12</sup> En este último se usaron 200 muestras de suero correspondientes a dos grupos, unas 100 de cada uno. Uno de los grupos estaba integrado por sujetos que, de acuerdo con los datos clínicos, parasitológicos y epidemiológicos, muy probablemente estaban infectados por *T. cruzi*; el otro incluía sujetos que habían nacido y vivían en zonas no endémicas del estado de Espírito Santo, Brasil, en condiciones socioeconómicas similares a las existentes en las zonas endémicas. En alrededor de la mitad de los sujetos probablemente in-

fectados —incluidos los pacientes con miocardiopatías y los que sufrían la forma indeterminada de la enfermedad— el xenodiagnóstico dio resultados positivos; el resto del grupo eran personas en quienes las diversas pruebas serológicas para detectar *T. cruzi* revelaron reactividad y cuyas historias clínicas y epidemiológicas eran compatibles con la enfermedad de Chagas.

## DESCRIPCION Y RESULTADOS

### Primer estudio comparativo

En este estudio, efectuado en 1981, cada laboratorio llevó a cabo sus propias pruebas y el diagnóstico se basó en los criterios aplicados en cada uno de ellos para determinar si los resultados eran positivos. El laboratorio argentino sometió los sueros a las pruebas de hemaglutinación (HA), inmunofluorescencia (IF) y aglutinación directa (AD); en el laboratorio brasileño se usaron las pruebas de HA, IF y fijación del complemento (FC), mientras que en el estadounidense se emplearon las pruebas de HA, FC y AD. En cada laboratorio se consideró que una muestra era positiva cuando era positivo el resultado de por lo menos una de las pruebas empleadas. Si bien fue excepcional que se obtuviera un resultado positivo en solo una prueba, se usó este criterio a causa de las formas subjetivas diferentes de evaluar los resultados de las pruebas individuales en los laboratorios. (Por ejemplo, uno de los laboratorios insistió en hacer un diagnóstico positivo siempre que una sola prueba de fijación del complemento diera resultados positivos.)

Para una evaluación comparativa de los diagnósticos de los laboratorios, se usaron estadísticos kappa para

<sup>12</sup> Este estudio se efectuó en coordinación con el Dr. C. la Fuente, Centro Nacional de Enfermedades Tropicales, Santa Cruz, Bolivia; el Dr. F. Guhl, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia; el Dr. H. Schenone, Departamento de Microbiología y Parasitología, Santiago, Chile, y el Dr. O. E. Sousa, Facultad de Medicina, Universidad de Panamá, Panamá.

medir la coincidencia corregida para eliminar posibles efectos aleatorios. (Kappa equivale a 0 cuando se trata de una mera coincidencia aleatoria, llega a + 1 cuando existe coincidencia total y muestra valores negativos en los casos en que la discrepancia es algo más que meramente aleatoria (1, 2).)

Los resultados obtenidos con los conjuntos de muestras de suero (cuadro 1) reflejaron no solo diferencias en cuanto a la reactividad de las pruebas empleadas por los distintos laboratorios, sino también diferencias entre los criterios aplicados para computar los sueros como positivos o negativos. Es preciso señalar que, en este estudio inicial, deliberadamente no se impusieron restricciones en relación con los procedimientos técnicos o pruebas utilizadas en cada laboratorio. En el cuadro 1 se muestra el grado de coincidencia bruta logrado en este estudio y el grado de coincidencia después del ajuste para eliminar efectos aleatorios. Como se puede observar, con los sueros brasileños (serie B) se obtuvo

una coincidencia algo mayor que con los argentinos (serie A).

## Segundo estudio comparativo

Con el fin de obtener resultados más uniformes, se establecieron protocolos para cada prueba y, en 1982, se realizó el segundo estudio con dos nuevos conjuntos de muestras de suero (A y B), preparados y distribuidos como en el estudio inicial. De acuerdo con lo solicitado por el Comité Directivo del Grupo Científico sobre Enfermedad de Chagas del Programa Especial PNUD/Banco Mundial/OMS de Investigaciones y Enseñanzas sobre Enfermedades Tropicales, además de las pruebas ya mencionadas se efectuaron otras pruebas de hemaglutinación con un reactivo co-

**CUADRO 1.** Grados de coincidencia de los diagnósticos, según una escala de 0 a 1, obtenidos por los tres laboratorios que participaron en los dos primeros estudios. En cada caso, la primera columna muestra el grado de coincidencia sin efectuar un ajuste para eliminar efectos aleatorios, y la segunda columna indica el grado de coincidencia ajustado de acuerdo con kappa. AR representa al laboratorio argentino, BR al brasileño y EU el estadounidense

Comparación de los resultados obtenidos en los laboratorios indicados	Primer estudio Indices de coincidencia		Segundo estudio Indices de coincidencia	
	Bruta	Ajustada	Bruta	Ajustada
Muestras de la serie A (argentinas)				
AR y BR	0,85	0,67	0,91	0,81
AR y EU	0,79	0,56	0,85	0,70
BR y EU	0,81	0,61	0,87	0,74
Muestras de la serie B (brasileñas)				
AR y BR	0,85	0,69	0,95	0,91
AR y EU	0,83	0,65	0,94	0,88
BR y EU	0,93	0,85	0,96	0,92

mercial; se escogió esta prueba porque se efectuaba ordinariamente en los tres laboratorios participantes.

Los resultados obtenidos con las series A y B, expresados como índice de coincidencia, revelaron una coincidencia algo mayor que los resultados del primer estudio (véanse las columnas 3 y 4 del cuadro 1). También se encontró que, variando las titulaciones límites usadas para definir si un determinado suero producía una respuesta positiva o negativa, se podía obtener una coincidencia aún mayor. (Por ejemplo, cambiando en un laboratorio la titulación límite en la prueba de AD de 1:16 a 1:32, el índice de especificidad mejoró al elevarse de 0,61 a 0,87, sin causar ninguna variación significativa en la sensibilidad de la prueba.)

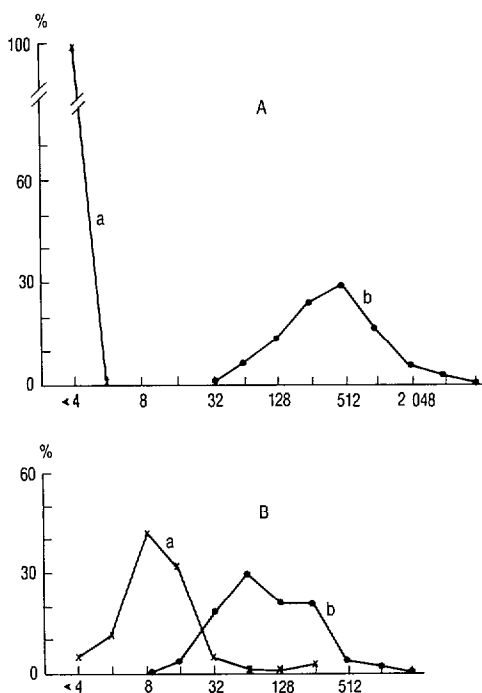
### Tercer estudio comparativo

En 1983, se distribuyeron a cada uno de los laboratorios participantes conjuntos que incluían las 200 muestras codificadas de suero, reunidas en la forma antes descrita, de las cuales alrededor del 50% provenían de pacientes con enfermedad de Chagas. Los laboratorios de la Argentina, el Brasil y los Estados Unidos llevaron a cabo las mismas pruebas que se habían efectuado en el segundo estudio. En los nuevos laboratorios y de acuerdo con el protocolo propio de cada uno de ellos, se realizaron las siguientes pruebas: IF y HA en Bolivia, HA en Chile, IF y la prueba de inmunoabsorbencia ligada a la enzima (ELISA) en Colombia, y ELISA en Panamá. Se decodificaron luego los resultados de cada prueba y se trazaron curvas de distribución que muestra-

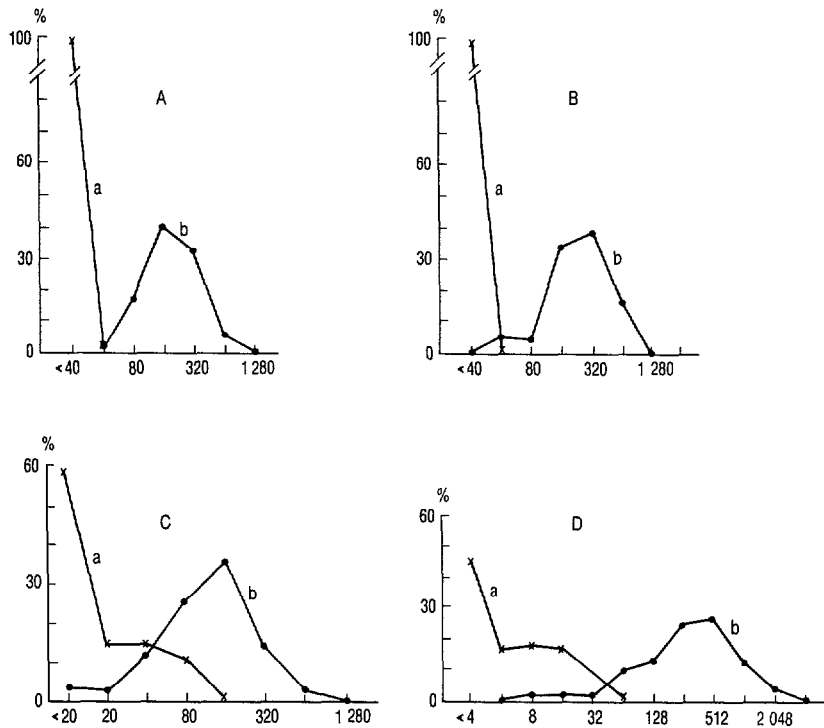
ban la frecuencia con que se obtuvieron distintas titulaciones con sueros provenientes de sujetos chagásicos y no chagásicos.

Las curvas resultantes revelaron varias características. Entre otras cosas, demostraron que existía una considerable variación de la aptitud de las distintas pruebas para discriminar entre sueros de personas infectadas y los de las no infectadas, aun cuando se efectuaron las pruebas en el mismo laboratorio (figura 1). También señalaron diferencias entre los resultados obtenidos con la misma prueba en distintos laboratorios (figura 2) y en distintos laboratorios

**FIGURA 1.** Curvas de distribución que muestran la frecuencia con que se obtuvieron determinadas titulaciones mediante las pruebas de hemaglutinación (A) y aglutinación directa (B) con 200 muestras de suero de sujetos no chagásicos (a) y chagásicos (b), efectuadas en un mismo laboratorio y usando el mismo conjunto de muestras para ambas pruebas



**FIGURA 2.** Curvas de distribución que muestran la frecuencia con que se obtuvieron determinadas titulaciones mediante pruebas de inmunofluorescencia con 200 muestras de suero de sujetos no chagásicos (a) y chagásicos (b), efectuadas en cuatro laboratorios diferentes (A, B, C y D) usando el mismo conjunto de muestras en cada laboratorio



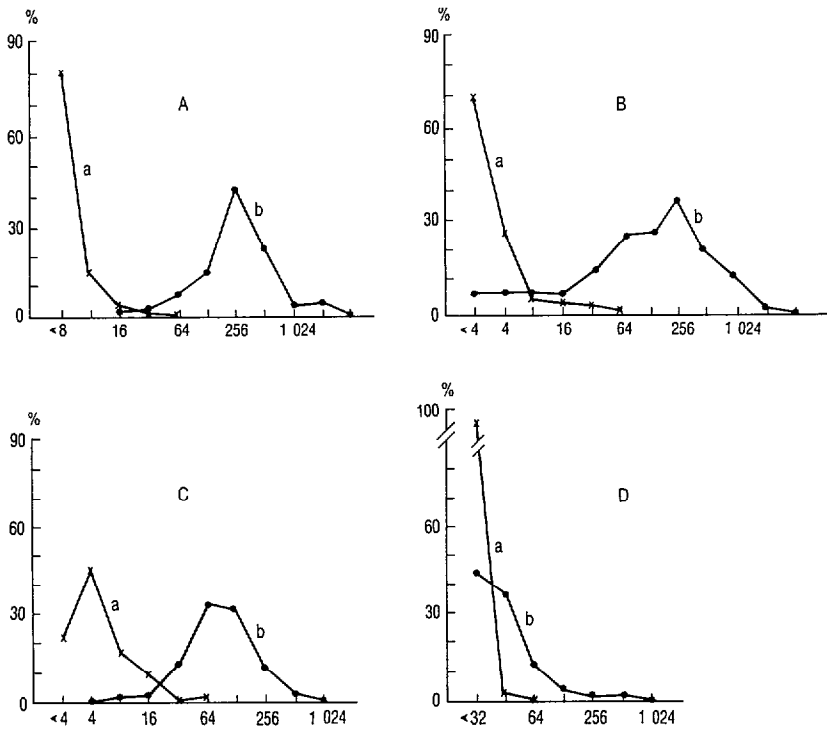
usando reactivos diferentes (figura 3), y proporcionaron un buen cuadro panorámico de las divergencias que producía el empleo de pruebas diferentes en distintos laboratorios, como se muestra en la figura 4. La utilidad de las curvas de distribución para evaluar la validez de las pruebas se pone de manifiesto en la similitud de los patrones obtenidos con las mismas pruebas en el mismo laboratorio, aun cuando se efectuaron con un intervalo de varios meses y con distintos con-

juntos de muestras. Las curvas de distribución correspondientes al segundo y al tercer estudio presentadas en la figura 5 muestran esa coincidencia.

## DISCUSION

Existen muchas circunstancias que dificultan la normalización del diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas. Se dispone de una serie de pruebas basadas en diversas técnicas y los laboratorios tienden a seleccionar determinadas pruebas de acuerdo con preferencias personales o la asequibilidad de equipos y reactivos. El hecho de que puede variar

**FIGURA 3.** Curvas de distribución que muestran la frecuencia con que se obtuvieron determinadas titulaciones mediante pruebas de hemaglutinación con 200 muestras de suero de sujetos no chagásicos (a) y chagásicos (b), efectuadas en cuatro laboratorios diferentes (A, B, C y D) usando el mismo conjunto de muestras y reactivos distintos en cada laboratorio



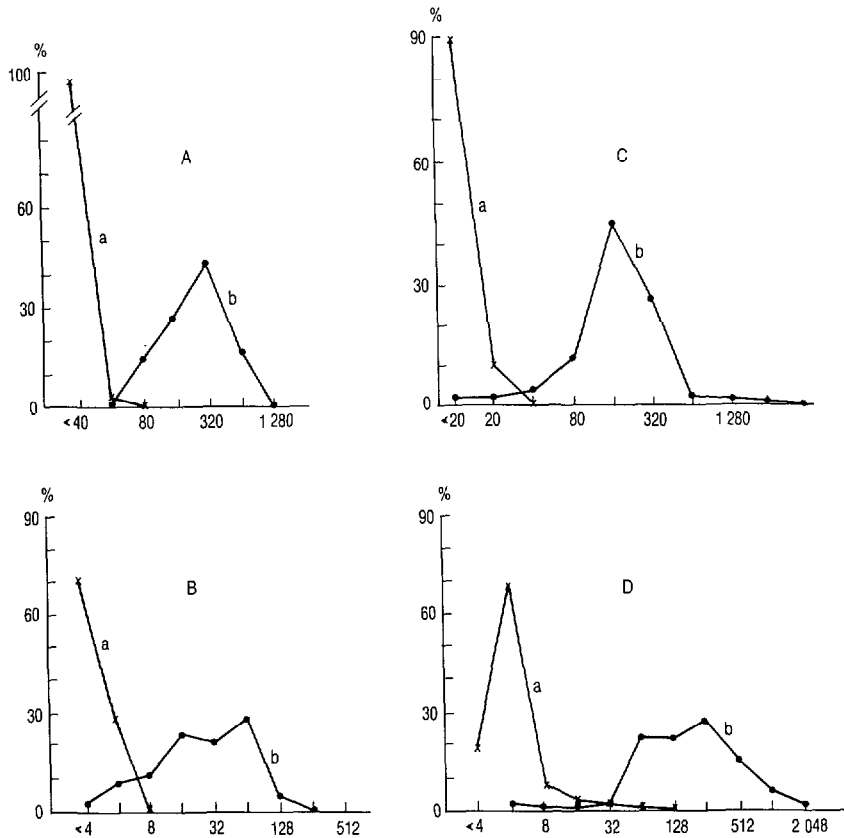
la calidad de distintos lotes de reactivo —o, incluso, lotes sucesivos provenientes de la misma fuente— aumenta las posibilidades de que se obtengan resultados heterogéneos y contradictorios.

Por otra parte, también pueden variar mucho los antígenos del parásito, de células completas a extractos en bruto de células o fracciones más o menos purificadas. No obstante, hay que señalar que se ha notificado (3) una gran coincidencia (del 96,9% en pruebas con más de 10 000 muestras de suero) en pruebas de hemaglutinación, fijación del complemento, inmunofluorescencia y floculación, empleando una serie de distintas preparaciones de antígenos. Esto indica que la principal ventaja de usar

componentes definidos de *T. cruzi* como los descritos en otros trabajos (4-7), en lugar de antígenos menos definidos (por ejemplo, extractos en bruto o parásitos completos), es que se evitan así reacciones cruzadas como las que a menudo se presentan en las infecciones por *Leishmania* (en particular en la infección visceral).

Las diferencias observadas entre pruebas en las que se emplearon antígenos similares, sumadas a la estre-

**FIGURA 4. Curvas de distribución que muestran la frecuencia con que se obtuvieron determinadas titulaciones con 200 muestras de suero de sujetos no chagásicos (a) y chagásicos (b), en pruebas de aglutinación directa en Argentina (A), hemaglutinación en los Estados Unidos (B), inmunoadsorcencia ligada a la enzima (ELISA) en Colombia (C), y ELISA en Panamá (D). Las muestras de suero provenían de sujetos brasileños y fueron enviadas por correo desde el Brasil a los laboratorios participantes**

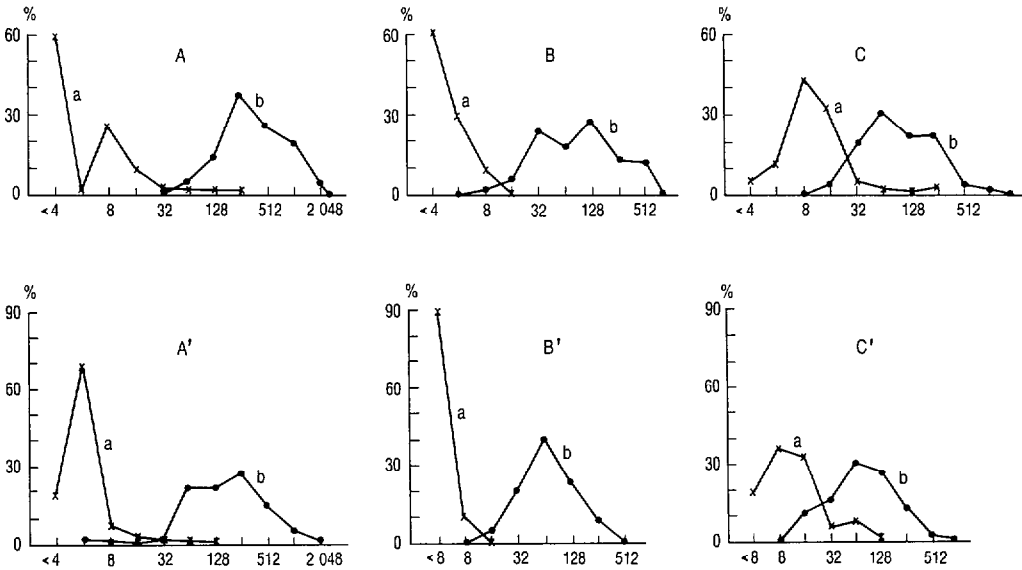


cha coincidencia antes señalada de pruebas con preparaciones muy diferentes de antígenos, indican claramente que las divergencias de las pruebas obedecen fundamentalmente a factores que interfieren en el mecanismo de señalización que expresa la reacción antígeno-anticuerpo como aglutinación, fijación del complemento, fluorescencia, etc.

De hecho, se sabe que los fenómenos que originan señales son propensos a sufrir una serie de influencias perturbadoras que tienden a introducir "ruido" o a reducir la intensidad de la señal. Por ejemplo, un conjugado de antiglobulinas de mala calidad puede provocar fluorescencia no específica o una tinción deficiente de los sueros reactivos; en el caso de las pruebas de hemaglutinación, las características de las soluciones diluyentes, las condiciones que afectan la capacidad de aglutinación



FIGURA 5. Curvas de distribución que muestran la frecuencia con que se obtuvieron determinadas titulaciones con dos conjuntos diferentes de muestras de suero en pruebas de aglutinación directa en el laboratorio A (diagramas A y A'), hemaglutinación en el laboratorio B (diagramas B y B') y aglutinación directa en el laboratorio C (diagramas C y C'). Los resultados presentados en los diagramas A', B' y C' se obtuvieron durante el tercer estudio, varios meses después de los que figuran en los diagramas A, B y C, correspondientes al segundo estudio



de las células y otros elementos pueden alterar la sensibilidad y especificidad de la prueba. Estos no son ejemplos aislados, ya que en realidad muchos factores como los mencionados pueden influir en cada tipo de prueba que se emplee.

También hay que señalar que pueden producirse respuestas positivas no específicas como consecuencia de la reacción de anticuerpos IgM "naturales" ante los antígenos de *T. cruzi*. Esos anticuerpos, que se encuentran en cantidades y frecuencias diversas en las distintas poblaciones (8), interfieren principalmente en pruebas tales como las de inmunofluorescencia y aglutinación directa, en las que se usan como antígenos parásitos completos.

Por otra parte, las diferencias regionales en cuanto a la actividad antigénica de las cepas locales de *T. cruzi* podrían originar diferencias regionales en

los resultados de las pruebas. No obstante, el empleo de antígenos complejos (constituidos por extractos u organismos parasitarios completos que contienen componentes comunes a diferentes cepas de *T. cruzi*), como en la investigación que exponemos en este artículo, reducirá al mínimo esas diferencias.

Las divergencias de los resultados de distintos laboratorios también pueden reducirse al mínimo si se notifica la reactividad relativa de los sueros con respecto a la de un suero positivo patrón. En este estudio se observó que, con esa normalización de las titulaciones en "unidades" relativas a un suero positivo

usado como patrón de referencia, no se logró corregir las divergencias de los diagnósticos. Sin embargo, un procedimiento de ese tipo podría ser una forma útil de corregir aquellas variaciones que dependen de diferencias de sensibilidad de las pruebas relacionadas con la intensidad de la señal producida, como en el caso de la fluorescencia.

Es evidente que una prueba específica, sensible y rigurosamente normalizada, con antígenos, reactivos y procedimientos definidos, podría constituir un patrón de referencia para evaluar otras pruebas y reactivos. No obstante, hasta que se determine un patrón de ese tipo, parece que los conjuntos de sueros con un definido diagnóstico positivo o negativo con respecto a la infección por *T. cruzi*, constituyen el mejor patrón de referencia asequible.

La propuesta de adoptar un conjunto de sueros de referencia que incluyera de 100 a 200 muestras o más representó un promisorio punto de partida. En consecuencia, se reunieron muestras de suero de sujetos con diagnóstico definido de presencia o ausencia de infección chagásica, de acuerdo con criterios independientes que comprendieron el xenodiagnóstico, resultados clínicos y datos epidemiológicos. Si bien todas las muestras de suero usadas en nuestros estudios provinieron de solo dos países (la Argentina y el Brasil), esos conjuntos de muestras podrían mejorarse en el futuro incluyendo muestras de otras fuentes.

En general, parece práctico caracterizar las pruebas particulares eva-

luando la reactividad obtenida, expresada en titulaciones séricas, al poner a prueba un solo conjunto de sueros chagásicos y no chagásicos. Al comparar pruebas diferentes, los resultados cuantitativos son más esclarecedores que los meramente cualitativos basados en una titulación límite o un grado de reactividad previamente establecidos. Se puede obtener una conveniente representación gráfica de cada prueba mediante curvas de distribución que muestren la frecuencia con que se obtuvieron determinadas titulaciones. De este modo, se expresa con claridad la capacidad de discriminación de la prueba y se pueden estudiar las causas de las limitaciones detectadas. Por ejemplo, los diagramas C y D de la figura 2 (donde se comparan las pruebas de inmunofluorescencia) indican que probablemente sea necesario mejorar la calidad del conjugado fluorescente. Asimismo, el diagrama D de la figura 3 (que compara pruebas de hemaglutinación) señala que es preciso investigar una probable sensibilización insuficiente de los eritrocitos. También hay que destacar que es posible obtener resultados similares en distintas ocasiones, incluso con conjuntos de sueros que incluyan muestras tomadas de sujetos diferentes y aun cuando se efectúen las pruebas con un intervalo de varios meses (figura 5).

En general, pareció excelente la estabilidad de los conjuntos de muestras conservadas con glicerina que se usaron en nuestro estudio. La figura 4 muestra que se obtuvieron resultados muy satisfactorios con sueros enviados por correo desde el Brasil a laboratorios tan distantes como los de la Argentina y Panamá. Como no se requieren temperaturas bajas para transportar las mezclas de suero y glicerina, esa estabilidad permite intercambiar conjuntos de muestras por correo, un método práctico, económico y exento de engorrosas demoras aduaneras.

# CONCLUSIONES

Hasta el momento, los laboratorios que efectúan pruebas serológicas para detectar la enfermedad de Chagas comúnmente han escogido sus reactivos y pruebas de acuerdo con su propia experiencia y las características particulares de la población atendida, incluyendo la prevalencia de infección en esa población.

Es también evidente que otras formas de diagnóstico de la enfermedad, como el xenodiagnóstico y otros métodos parasitológicos, tienen limitaciones considerables. No obstante, la evaluación de métodos serológicos para detectar la enfermedad de Chagas por lo general se ha basado en el xenodiagnóstico, combinado con datos provenientes de diversos procedimientos de diagnóstico clínico. En consecuencia, la sensibilidad y especificidad aparentes determinadas por la evaluación, no son necesariamente valores "reales" sino solo valores relativos medidos en términos de la sensibilidad y especificidad de los otros métodos. Aun una comparación detallada de los resultados del diagnóstico obtenidos con cada sujeto, produce tan sólo valores "copositivos" y "conegativos" que corresponden a la respectiva probabilidad de obtener resultados positivos o negativos con ambos procedimientos.

Por consiguiente, además de la variedad de pruebas (que es conveniente) y de la diversidad de las técnicas (inevitable), el principal problema en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas se relaciona con los criterios de referencia adoptados para determinar la sensibilidad y la especificidad de las pruebas comúnmente usadas. En general, como consecuencia de los intercambios efectuados entre los laboratorios en el pasado, parece probable que esas pruebas no sean independientes y mantengan relaciones complejas y variables entre sí.

Sin embargo, nadie puede estar seguro de que las pruebas coincidirán cuando se apliquen al mismo conjunto de muestras de suero en laboratorios diferentes. En realidad, la comparación de las titulaciones obtenidas en nuestros estudios indica que es prácticamente imposible lograr una coincidencia absoluta; incluso el análisis de los resultados de acuerdo con el diagnóstico definitivo (ya sea que los sueros fueran positivos o negativos), revela que la copositividad y la conegatividad no llegaron al 100%, a pesar de que se seleccionó la titulación "límite" óptima.

En consecuencia, un buen punto de partida para lograr la normalización continental del diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas podría ser la distribución de conjuntos idénticos de muestras de suero, con una definición precisa de los valores mínimos aceptables en cuanto a sensibilidad y especificidad, en los principales laboratorios de diagnóstico de América Latina. De hecho, estos valores serían meramente índices de copositividad y conegatividad, ya que en la mayoría de los casos solo se puede hacer un diagnóstico probable. Sin embargo, el establecimiento de parámetros de este tipo para ese conjunto de sueros haría posible que los laboratorios reprodujeran un patrón uniforme.

Como medio de garantizar la comparabilidad de los resultados, se recomienda efectuar las pruebas con el mismo conjunto de sueros normalizados. No obstante, este conjunto patrón debe ser modificado a medida que la labor se extienda en las Américas y se introduz-

can nuevas muestras de suero en el estudio. Sin duda, solo la labor futura podrá determinar cuáles son las modificaciones apropiadas; la composición del conjunto de muestras debe ser entonces dinámica, cambiante, de tal modo que proporcione una comparabilidad satisfactoria a nivel continental entre laboratorios que trabajan con una amplia gama de condiciones locales.

Otro problema importante que requiere atención es en qué medida las pruebas serológicas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas producirán beneficios públicos. En general, los beneficios que se obtengan dependerán del valor de pronóstico, positivo o negativo, de las pruebas empleadas. Más allá de esto, una vez que se pueda evaluar la validez de las pruebas en función de un conjunto patrón de muestras de suero sometido a pruebas por otros laboratorios, los beneficios dependerán entonces de la prevalencia real de la enfermedad en la población que se va a investigar y de los objetivos que se establezcan para el programa de detección.

Por supuesto, es posible introducir deliberadamente y con distintos propósitos variaciones en cuanto a la sensibilidad y especificidad de las pruebas, por ejemplo, para examinar donantes de sangre o para detectar sujetos asintomáticos pero probablemente infectados, que necesitarían un tratamiento preventivo con el fin de evitar consecuencias clínicas secundarias. Además, se pueden fijar valores límites en las pruebas, que reflejen la realidad local, estableciendo esos valores de acuerdo con la prevalencia local de la infección y las frecuencias de distribución de las titulaciones correspondientes a personas infectadas y no infectadas. Sin embargo, ninguna de estas consideraciones reduce la necesidad de un patrón común de referencia y, de hecho, todo hace pensar que el establecimiento de tal patrón producirá impor-

tantes beneficios para la salud pública en las zonas donde es endémica la enfermedad de Chagas.

En cuanto al futuro, hay que señalar que actualmente se está llevando a cabo en las Américas una cuarta serie de pruebas con la participación de un mayor número de laboratorios y empleando un conjunto definido de muestras de suero.

## RESUMEN

En 1981, se inició en la Argentina, el Brasil y los Estados Unidos de América un estudio en colaboración con el propósito de establecer un programa continental de normalización del diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas. Con dos conjuntos de muestras de suero, uno reunido en la Argentina y el otro en el Brasil, en un laboratorio de cada uno de los tres países se efectuaron pruebas serológicas empleando los procedimientos y reactivos ordinariamente usados en esos laboratorios. Se estableció una técnica para facilitar el intercambio de muestras de suero. Luego se realizó una segunda serie de pruebas siguiendo protocolos uniformes. Estas pruebas, con un conjunto de muestras de suero provenientes de sujetos aparentemente infectados y no infectados, incluyeron una prueba de hemaglutinación en la cual los tres laboratorios utilizaron el mismo reactivo comercial.

A estos dos estudios siguió una tercera serie de pruebas en las que se empleó un conjunto de muestras de suero de sujetos infectados con *T. cruzi* y de personas no infectadas, de acuerdo con un diagnóstico con un alto grado de

probabilidad, basado en datos clínicos, parasitológicos y epidemiológicos. Otros cuatro laboratorios de Bolivia, Colombia, Chile y Panamá participaron en este tercer estudio.

Los resultados de la primera serie de pruebas reflejaron notables diferencias en cuanto a la reactividad de las diversas pruebas serológicas y también en los criterios usados para computar los sueros como positivos o negativos. En el segundo estudio fue algo mayor la coincidencia entre los resultados de los tres laboratorios y se demostró que, variando las titulaciones límites usadas para definir si un determinado suero era positivo o negativo, se podía lograr una coincidencia aún mayor.

La tercera serie de pruebas puso de relieve varios aspectos. Se comprobó que variaba considerablemente el valor de diagnóstico de las distintas pruebas, aun cuando estas se efectuaran en el mismo laboratorio. También se revelaron importantes diferencias entre los resultados obtenidos con la misma prueba en laboratorios diferentes y con pruebas distintas también en laboratorios diferentes.

En la actualidad no es posible establecer normas perfectas para el diagnóstico de la infección chagásica ya que no existe un método de diagnóstico absolutamente seguro. En consecuencia, la sensibilidad y la especificidad aparentes de una determinada prueba no son necesariamente reales, sino que más bien se trata de sensibilidad y especificidad rela-

tivas con respecto a las de otros métodos. Por consiguiente, además de la diversidad de pruebas y técnicas disponibles, un problema fundamental para el diagnóstico de infecciones chagásicas es la ausencia de criterios sólidos de referencia. En este contexto, parece que un buen punto de partida para la normalización del diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas en las Américas sería la distribución de conjuntos idénticos de muestras de suero, con una definición precisa de los valores mínimos aceptables en cuanto a sensibilidad y especificidad, en los principales laboratorios de diagnóstico involucrados. Esto haría posible que los laboratorios participantes siguieran normas uniformes y esas normas, al aumentar la exactitud de los diagnósticos y los conocimientos epidemiológicos, podrían producir importantes beneficios para la salud pública en zonas donde es endémica la enfermedad de Chagas. □

## REFERENCIAS

- 1 Fleiss, J. L., Cohen, J. y Everitt, B. S. Large simple standard error of Kappa and weight Kappa. *Psychol Bull* 72:323, 1969.
- 2 Cohen, J. A coefficient of agreement for nominal scale. *Educ Psychol Meas* 20:37, 1970.
- 3 Takei, K. Estudo da eficiência relativa dos diferentes testes sorológicos utilizados no diagnóstico da doença de Chagas: Resultados observados na análise de 10 181 soros. Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1982. Tesis doctoral.
- 4 Snary, D. y Hudson, L. *Trypanosoma cruzi* cell surface proteins: Identification of one major glycoprotein. *FEBS Lett* 100:166, 1979.
- 5 Araujo, F. G. y Remington, L. S. Characterization of stages and strains of *Trypanosoma cruzi* by analysis of cell membrane components. *J Immunol* 127:855-859, 1981.

6 Nogueira, N., Chaplan, S., Tydings, J. D., Unkeless, J. y Cohn, Z. *Trypanosoma cruzi*: Surface antigens of blood and culture forms. *J Exp Med* 153:629-639, 1981.

7 Scharfstein, J., Rodrigues, M. M., Alves, C. A., De Souza, W., Previato, J. O. y Mendonça-Previato, L. *Trypanosoma cruzi*: Description of a highly purified surface antigen defined by human antibodies. *J Immunol* 131:972-976, 1983.

8 Storni, P., Bolsi, F. J. y Yanovsky, J. F. Reacción de aglutinación directa para diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Utilización sistemática del 2-mercapto-ethanol para la eliminación de las aglutininas inespecíficas. *Medicina* (Buenos Aires) 35:67, 1975.

## SUMMARY

### THREE YEARS OF COLLABORATION ON THE STANDARDIZATION OF CHAGAS' DISEASE SERODIAGNOSIS IN THE AMERICAS: AN APPRAISAL

A collaborative study aimed at developing a continental standardization program for the serodiagnosis of Chagas' disease was begun in Argentina, Brazil, and the United States in 1981. Using two panels of sera, one collected in Argentina and one in Brazil, single laboratories in the three countries conducted serologic tests according to procedures and with reagents regularly used at those laboratories. A technique was developed to facilitate the interchange of serum samples. A second set of trials was then done, following uniform protocols. These trials, which tested a panel of sera from apparently infected and apparently uninfected subjects, included a hemagglutination test in which all three laboratories used the same commercial reagent.

These two sets of trials were followed by a third using a panel of sera with samples from subjects infected with *T. cruzi* and uninfected subjects—as diagnosed to a high degree of probability on clinical, parasitologic, and epidemiologic grounds. Four additional laboratories in Bolivia, Chile, Colombia, and Panama participated in these third trials.

The results of the first trials reflected noteworthy differences in the reactivity of the various serologic tests and also in the criteria used to score sera as positive or negative. The second trials showed somewhat better agreement between the three laboratories' results and indicated that by varying the cutoff titers used to define whether a given serum was positive or negative even closer agreement could be attained.

The third trials brought out a variety of points. They demonstrated that the diagnostic value of different tests varied considerably, even when the tests were performed in the same laboratory. They also highlighted important differences between the results obtained with the same test at different laboratories and with different tests at different laboratories.

At present it is not possible to establish a perfect standard for diagnosis of chagasic infection because no completely sure diagnostic method exists. Therefore, a given test's apparent sensitivity and specificity are not necessarily its true ones but are rather its sensitivity and specificity measured relative to those of other methods. Thus, besides the diversity of available tests and techniques, a prime problem in diagnosing chagasic infec-

tions is the absence of firm reference criteria. Within this context, it appears that a good start on standardization of Chagas' disease serodiagnosis in the Americas could be made by distributing identical serum panels, with

the minimum acceptable sensitivity and specificity values precisely defined, to the main diagnostic laboratories involved. This should make it possible for the participating laboratories to follow uniform standards; and such standards, by improving diagnostic accuracy and epidemiologic knowledge, would seem calculated to yield important benefits for public health in Chagas-endemic zones.

## **Donación del BID a la campaña antipoliomielítica**

El Banco Interamericano de Desarrollo ha contribuido con una donación a la campaña de erradicación de la poliomielitis en las Américas, lanzada en mayo de 1985 por la Organización Panamericana de la Salud. Estos fondos, junto con los que han contribuido otros organismos, financiarán el programa general de vigilancia epidemiológica, inmunización y control de brotes que se está realizando en los países de América Latina y el Caribe con la cooperación de los ministerios de salud. La incidencia de la poliomielitis ha disminuido espectacularmente desde 1978, cuando se organizó el Programa Ampliado de Inmunización para combatir las enfermedades prevenibles por vacunación. El número de casos notificados en la Región disminuyó en 90%, de 1979 a 1984. Mediante la actual campaña se está inmunizando a 114 millones de niños, incluyendo a todos los menores de cinco años. Se notifican y se investigan todos los casos sospechosos y cualquier caso confirmado es seguido de la vacunación masiva de niños en la zona inmediata y en las circunvecinas.