

**REPRODUCIBILIDAD DE LAS PRUEBAS SEROLÓGICAS PARA EL
DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR CHAGAS EN GESTANTES DE ZONA
ENDÉMICA EN SANTANDER**

YENY ZULAY CASTELLANOS DOMÍNGUEZ



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MEDICINA - DEPARTAMENTO DE SAL UD PÚBLICA
MAESTRÍA EN EPIDEMIOLOGÍA
BUCARAMANGA
2013**

**REPRODUCIBILIDAD DE LAS PRUEBAS SEROLÓGICAS PARA EL
DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR CHAGAS EN GESTANTES DE ZONA
ENDÉMICA EN SANTANDER**

YENY ZULAY CASTELLANOS DOMINGUEZ

Trabajo de grado para optar al título de
Magister en Epidemiología

Director

**LUIS CARLOS OROZCO VARGAS
MD. MSc EPIDEMIOLOGÍA**

Codirectora

**ZULMA MILENA CUCUNUBÁ PÉREZ
MD. M Sc SALUD PÚBLICA**



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MEDICINA - DEPARTAMENTO DE SALUD PÚBLICA
MAESTRÍA EN EPIDEMIOLOGÍA
BUCARAMANGA
2013**

AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser siempre el faro que me guió en el camino que tomé al decidir hacer la maestría y nunca permitió que desfalleciera ante las circunstancias.

A mi familia por el apoyo incondicional, la tolerancia y el ánimo.

Al profesor Luis Carlos Orozco por su paciencia y dedicación.

A la doctora Zulma Cucunubá por creer en mí.

A los docentes de la maestría en Epidemiología por compartir sus conocimientos con amor y consagración.

A mis compañeras de la quinta cohorte de la maestría en Epidemiología, compañeros de la Universidad de Santander y mis amigos por la motivación.

Al Grupo de Parasitología del Instituto Nacional de Salud, Grupo de Parasitología molecular de la Pontificia Universidad Javeriana, a la coordinación de vigilancia entomológica y equipos provinciales de la Secretaria de Salud Departamental de Santander y al Laboratorio Departamental de Salud Pública de Santander por la logística en la consecución y procesamiento de las muestras.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	16
1. OBJETIVOS.....	19
1.1 OBJETIVO GENERAL	19
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
2. MARCO TEORICO	20
2.1 ESTUDIOS DE EVALUACIÓN DE TECNOLOGÍA DIAGNÓSTICA.....	20
2.1.1 Tipos de muestreo	21
2.1.2 Fases de estudios de tecnología diagnóstica	22
2.1.3 Confiabilidad de pruebas diagnósticas	24
2.1.4 Validez	30
2.1.4.1 Validación aparente o facial	30
2.1.4.2 Validación de contenido.....	30
2.1.4.3 Validación de constructo	30
2.1.4.4 Validación de criterio.....	30
2.2 GENERALIDADES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	32
2.3 AGENTE CAUSAL DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	32
2.4 DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN CON <i>Trypanosoma cruzi</i>	34
2.4.1 Pruebas serológicas para el diagnóstico de la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i>	34

2.4.1.1 Fijación de complemento (FC)	35
2.4.1.2 Hemaglutinación Indirecta (HAI)	36
2.4.1.3 Inmunofluorescencia Indirecta	37
2.4.1.4 Inmunoensayo Ligado a una Enzima (ELISA)	40
2.4.1.5 Inmunoensayo en capa fina (ICF)	45
Pruebas parasitológicas para el diagnóstico de la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i>	49
2.4.2.1 Xenodiagnóstico	49
2.4.2.2 Directo.....	49
2.4.2.3 Hemocultivo	50
2.4.2.4 Strout	50
2.5 EPIDEMIOLOGÍA	52
2.6 SESGOS.....	59
2.6.1 Sesgos de selección	60
2.6.2 Sesgos de clasificación.....	60
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	62
3.1 TIPO DE ESTUDIO.....	62
3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA	62
3.2.1 Población blanco Gestantes de zona endémica de Santander.....	62
Población de estudio Gestantes de zona endémica de Santander.....	62
3.3 DISEÑO DE MUESTREO	62

3.4 CÁLCULO DEL TAMAÑO DE MUESTRA	63
3.5 CRITERIOS DE SELECCIÓN.....	63
3.5.1 Criterios de inclusión.....	63
3.6 VARIABLES DEL ESTUDIO	64
3.6.1 Variables sociodemográficas	64
3.7 CONTROL DE POSIBLES SESGOS.....	64
3.7.1 Sesgo de selección.....	64
3.7.2 Sesgo de clasificación	65
3.8 RECOLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	65
3.9. ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN	68
3.9.1 Concordancia.....	68
3.9.2. Reproducibilidad de variables continuas.....	68
3.9.3. Reproducibilidad de variables dicotómicas	68
3.9.4. Comparación de la reproducibilidad.....	68
4. CONSIDERACIONES ÉTICAS	73
5. RESULTADOS.....	74
5.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO.....	74
5.2 ANÁLISIS DE CONCORDANCIA	77
5.3 ANÁLISIS DE REPRODUCIBILIDAD DE VARIABLES CONTINUAS MEDIANTE COEFICIENTE DE CORRELACIÓN INTRACLASE (CCI)	79

5.4 ANÁLISIS DE REPRODUCIBILIDAD DE VARIABLES DICOTÓMICAS MEDIANTE KAPPA	80
5.5 COMPARACIÓN DE ÍNDICES KAPPA ENTRE ELISA, IFI Y HAI.....	83
5.6 DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE INFECCIÓN POR <i>T. cruzi</i>	84
6. DISCUSIÓN	85
6.1 HAI.....	86
6.2 IFI.....	87
6.3 ELISA.....	87
6.4 ELISA, IFI y HAI.....	90
6.5 LIMITACIONES.....	93
6.6 FORTALEZAS	93
7.CONCLUSIONES	95
8. RECOMENDACIONES.....	96
BIBLIOGRAFIA.....	97
ANEXOS	110

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Interpretación del valor del coeficiente Kappa	29
Tabla 2. Resumen de las características de algunos estudios que se han evaluado la reproducibilidad de las pruebas serológicas para el diagnóstico de infección con <i>T. Cruzi</i>	46
Tabla 3. Métodos diagnósticos para la infección por <i>T. cruzi</i> desde el descubrimiento de la enfermedad hasta hoy	52
Tabla 4. Prevalencia de infección por <i>T. cruzi</i> en gestantes.....	55
Tabla 5. Datos individuales de las pruebas para el cálculo de la covarianza	69
Tabla 6. Datos para determinación de covarianza para ELISA y HAI.....	71
Tabla 7. Datos para determinación de Covarianza para IFI y ELISA.....	71
Tabla 8. Datos para determinación de Covarianza para IFI y HAI	72
Tabla 9. Caracterización de las gestantes de zona endémica de donde fue obtenida la muestra para el análisis de reproducibilidad de pruebas serológicas para el diagnóstico de infección por <i>Trypanosoma cruzi</i>	75
Tabla 10. Valores de CCI para la prueba de ELISA en muestra de suero y eluido sanguíneo	80
Tabla 11. Valores de Kappa para las tres pruebas realizadas para los diferentes puntos de corte analizados	81
Tabla 12. Valores de kappa y varianza empleados para determinar valores de Z.....	83
Tabla 13. Datos consolidados para determinación de Z y valor de <i>p</i>	83
Tabla 14. Prevalencias encontradas para infección por <i>T. cruzi</i> con cada una de las pruebas serológicas con el punto de corte establecido.....	84

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Límites de acuerdo para ELISA En suero lecturas 1 y 2	77
Gráfica 2. Límites de acuerdo entre ELISA suero lectura 1 vs ELISA eluído sanguíneo	78

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES.....	111
ANEXO B. CUESTIONARIO	115
ANEXO C. CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	117

ABREVIATURAS O SIGLAS PRINCIPALES USADAS

Abreviatura o sigla	Nombre completo
CCI	Coeficiente de Correlación Intraclase
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E	Especificidad
ELISA	Inmunoensayo Ligado a una Enzima
FC	Fijación de Complemento
HAI	Hemaglutinación Indirecta
ICF	Inmunoensayo en Capa Fina
IFI	Inmunofluorescencia Indirecta
IgG	Inmunoglobulina de Fase Crónica
IgM	Inmunoglobulina de Fase Aguda
mm3	Milímetro cúbico
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de Salud
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
QROC	Calidad de la Curva Receptor Operador
ROC	Curva Receptor Operador
S	Sensibilidad
UI	Microlitro
µm	Micra
VPN	Valor Predictivo Negativo
VPP	Valor Predictivo Positivo

RESUMEN

TITULO: REPRODUCIBILIDAD DE LAS PRUEBAS SEROLÓGICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR CHAGAS EN GESTANTES DE ZONA ENDÉMICA EN SANTANDER*

AUTORA: YENY ZULAY CASTELLANOS DOMÍNGUEZ**

PALABRAS CLAVE: enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, mujeres embarazadas, pruebas serológicas, reproducibilidad de resultados.

Introducción: El diagnóstico de infección por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) en fase crónica, está dado por pruebas serológicas descritas en la literatura en cuanto a la validez entendida ésta como sensibilidad y especificidad. No obstante la confiabilidad de las mismas, determinada por la reproducibilidad de éstas herramientas diagnósticas, no ha sido documentada en estudios realizados de la mejor manera, es decir, con muestreos adecuados.

Objetivo: Evaluar la reproducibilidad de las pruebas serológicas (ELISA, IFI y HAI) para el diagnóstico de la infección por chagas en gestantes de zona endémica en Santander.

Metodología: Se realizó un estudio de evaluación de tecnología diagnóstica, en el componente de reproducibilidad y acuerdo, en gestantes de zona endémica de Santander para la enfermedad de Chagas, quienes fueron seleccionadas mediante muestreo de corte transversal, para determinar reproducibilidad de las pruebas ELISA, IFI y HAI. Se analizaron las variables sociodemográficas para caracterizar la muestra. Se usó el software Stata versión 10.0 para análisis estadísticos.

Resultados: Se evaluaron 777 muestras. En muestra de suero ELISA (punto de corte 0,3), IFI (punto de corte 1/32) y HAI (punto de corte 1/16) presentaron kappa mayor a 0,8; no existen diferencias estadísticamente significativas entre las tres pruebas evaluadas. En eluído sanguíneo obtenido de papel filtro, el kappa estuvo por debajo de 0,8.

Conclusiones: las tres pruebas serológicas en muestra de suero presentan una reproducibilidad perfecta, determinada mediante kappa, por lo que la selección de cualquiera de ellas es útil para establecer el diagnóstico de infección por *T. cruzi*. El Elisa por su simplicidad y costo se recomienda como prueba de elección de los programas de tamizaje.

* Proyecto de Grado

**Universidad Industrial de Santander. Escuela De Medicina - Departamento De Salud Pública. Director. LUIS CARLOS OROZCO VARGAS. MD. MSc EPIDEMIOLOGÍA. Codirectora. ZULMA MILENA CUCUNUBÁ PÉREZ. MD. Msc SALUD PÚBLICA.

SUMMARY

TITLE: REPRODUCIBILITY OF SEROLOGICAL TESTS FOR THE DIAGNOSIS OF *Trypanosoma cruzi* INFECTION IN PREGNANT WOMEN IN ENDEMIC AREA OF SANTANDER*

AUTHOR: YENY ZULAY CASTELLANOS DOMÍNGUEZ**

KEY WORDS: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, pregnant women, serologic tests, Reproducibility of Results.

Description: Diagnosis of infection with *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) in chronic phase, is given by serological tests that have been widely described in the literature as to its validity understood these characteristics as sensitivity and specificity. However the reliability thereof, determined by the reproducibility of these diagnostic tools has not been documented in studies performed adequately, transverse sampling.

Objective: To evaluate the reproducibility of serological tests (ELISA, IFI and HAI) for the diagnosis with Chagas infection in pregnant women in endemic area in Santander.

Methods: We performed a study evaluating diagnostic technology for reproducibility and agreement, in pregnant women living in endemic area of Santander for Chagas disease, who were selected by transverse sampling random, to determine the reproducibility of the ELISA, IFA and HAI. Sociodemographic variables were analyzed to characterize the sample. Analyzes were performed in the Stata software version 10.0.

Results: Seven hundred and seventy seven samples were evaluated. ELISA serum sample (cutoff of 0.3), IFI (cutoff at dilution 1/32) and HAI (with cutoff at 1/16) had kappa values greater to 0 , 8 and no statistically significant differences between the three tests evaluated. kappa in eluate was below to 0.8. ELISA is recommended for diagnosis Chagas disease.

Conclusions: the three serological tests evaluated serum sample present perfect reproducibility, determined by weighted kappa, so selecting any of them is useful for diagnosis of infection with *T. cruzi*. Due to Elisa its simplicity and cost is recommended as test of choice for screening programs.

* Graduation Project

** Industrial University of Santander. Medical School - Department of Public Health. Director. OROZCO LUIS CARLOS VARGAS. MD. MSc Epidemiology. Co-director. MILENA ZULMA Cucunuba PEREZ. MD. PUBLIC HEALTH Msc.

INTRODUCCIÓN

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas constituye un serio problema de salud pública en Latinoamérica; aproximadamente 10 millones de personas están infectadas con el parásito tisular *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), y 40 millones están en riesgo de adquirir la infección¹. En Colombia se estima que la población que vive en zonas endémicas, expuestas o en riesgo de infección, es de 4.792.000 habitantes, que el número de infectados es de 436.000, de los cuales cerca de 131.500 sufren de cardiopatía chagásica crónica, y que el número de casos nuevos de infección que ocurren al año por transmisión vectorial es de 5.250².

El principal mecanismo de transmisión es el vectorial, los programas de vigilancia y control de vectores en países donde la infección es endémica han intentado controlar la transmisión por ésta vía y esto ha hecho que el número de casos asociados con los insectos hematófagos estén en disminución, no obstante no es la única forma de adquirir el parásito pues existen otras rutas como la vertical (madre infectada contagia al hijo a través de la circulación transplacentaria), la transfusional (por parásitos presentes en los componentes de las unidades transfusionales) y por trasplante de órganos por las que se puede instaurar el *T. cruzi* en los órganos blanco entre los que se incluye corazón, colon y esófago^{3 4}.

El diagnóstico de la infección está constituido por pruebas serológicas y parasitológicas las que son utilizadas según la fase de la infección en la que se

¹ Schofield C, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. Trends in Parasitology. 2006; 22 (12): 583-8.

² OMS/OPS. Consulta técnica sobre información educación y comunicación (IEC) en enfermedad de Chagas congénita. CLAP, Montevideo, Uruguay, 17 y 18 de mayo de 2007.

³ Angulo VM. Aspectos ecológicos de la enfermedad de Chagas en el oriente de Colombia. Revista MVZ de Córdoba. 2000; 5 (1): 64-8.

⁴ Palacios X, Belli A, Espino AM. Detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en Somoto, Nicaragua, mediante ELISA indirecto e IFI en muestras de sangre en papel de filtro. Rev Panam Salud Pública. 2000; 8 (6): 411-17.

encuentre el individuo. En la fase aguda, cuando los parásitos se encuentran en sangre periférica, las pruebas diagnósticas empleadas son las parasitológicas ya que es posible visualizar el tripanosomátide en sangre; en contraste en la fase crónica, cuando no hay parásitos en circulación, el diagnóstico de infección se establece mediante pruebas serológicas que detectan la presencia de anticuerpos que indican un contacto previo con el parásito⁵.

Estudios realizados en países endémicos para la enfermedad de Chagas en Suramérica han encontrado que la prevalencia de infección por *Trypanosoma cruzi* en las gestantes puede ser desde 1,7% hasta el 80%⁶; mientras que la transmisión congénita oscila entre 1% hasta 12%^{7 8 9 10}.

Usualmente, el Inmunoensayo Ligado a una Enzima (ELISA) y la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) son empleados como pruebas para el diagnóstico de infección en la fase indeterminada y crónica de la infección¹¹; la sensibilidad del ELISA, al usar como estándar de oro la IFI, puede estar por encima del 80%¹². Varios estudios han demostrado que la sensibilidad de las

⁵ Anthony R, Johnson C, Sousa O. Use of micro-ELISA for quantitating antibody to *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. Am. J. Trop. Hyg. 1979; 28 (6): 969-73.

⁶ Mendoza CA, Córdova E, Ancca J, Saldaña J, Torres A, et al. Prevalencia de la enfermedad de Chagas en puérperas y transmisión congénita en una zona endémica del Perú. Rev Panam Salud Pública. 2005; 17(3): 147-53.

⁷ Bern C, Verastegui M, Gilman R, Lafuente C, Galdos G, Calderón M, et al. Congenital *Trypanosoma cruzi* transmission in Santa Cruz, Bolivia. Clin Infect Dis. 2009; 49: 1667-74.

⁸ Blanco SB, Segura EL, Cura EN, Chuit R, Tulián L, Flores I, et al. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: an operational outline for detecting and treating infected infants in north-western Argentina. Trop Med Int Health. 2000; 5 (4): 293-01.

⁹ Brutus L, Scheider D, Postigo J, Romero M, Santalla J, et al. Congenital Chagas disease: diagnostic and clinical aspects in an area without vectorial transmission, Bermejo, Bolivia. Acta Trop. 2008;106 (3): 195-9.

¹⁰ Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Congenital transmission of Chagas disease - Virginia, 2010. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2012;61(26): 477-9.

¹¹ Figueredo J, Kaneda Y, Tachibana H, Furushima R, Tateno S. Epidemiological survey of *Trypanosoma cruzi* infection in north-eastern Brazil using different diagnostic methods. Rev. Inst. Med. Trop. 1991; 33 (3): 193-8.

¹² Zicker F, Smith PG, Luquetti AO, Oliveira OS. Mass screening for *Trypanosoma cruzi* infections using the immunofluorescence, ELISA and haemagglutination tests on serum samples and on blood eluates from filter- paper. Bull World Health Organ. 1990; 68 (4): 465-71.

pruebas serológicas mejora con el empleo de cepas locales de *T. cruzi* como antígeno, al compararlas con la sensibilidad obtenida por pruebas comerciales^{13 14}.

En Colombia para las autoridades en salud pública es importante el control de la transmisión de la infección por la ruta vertical (madre-hijo). Por consiguiente, se hace necesario establecer la calidad de las pruebas serológicas con las que se realiza el diagnóstico de la infección en gestantes de zona endémica para optimizar los recursos destinados al diagnóstico de este evento e identificar el test que sea más apropiado para tal fin.

Adicional a lo anteriormente dicho, cabe mencionar que no está claramente establecido el patrón de referencia para el diagnóstico de la infección ya que no hay un consenso sobre la calidad de cada una de éstas pruebas diagnósticas empleadas para este evento.

Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue determinar y comparar la reproducibilidad de las pruebas ELISA, IFI y HAI para el diagnóstico de infección de *T. cruzi* en gestantes de zona endémica de Santander.

¹³ Gutierrez R. Métodos convencionales de diagnóstico. En: Angulo VM. Curso Taller Internacional Control y Manejo de la Tripanosomiasis Americana. Bucaramanga Universidad Industrial de Santander Centro de Investigaciones Tropicales: AgrEvo; 1999: 16-9.

¹⁴ Enciso C, Montilla M, Santacruz M, Nicholls RS, Rodríguez A, et al. Comparación de la prueba de inmunofluorescencia indirecta, un inmunoensayo enzimático y la prueba comercial Chagatek para la detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi*. *Biomédica*. 2004; 24: 104-8.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la reproducibilidad de las pruebas ELISA, IFI y HAI en gestantes que viven en zona endémica de Santander para la enfermedad de Chagas.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Conocer la reproducibilidad de la prueba de ELISA en suero y en elúido sanguíneo; de la IFI y la HAI leídas en muestra de suero en dos momentos diferentes.
- Determinar cuál es la prueba con mejor reproducibilidad para el tamizaje de gestantes de zona endémica.

2. MARCO TEORICO

2.1 ESTUDIOS DE EVALUACIÓN DE TECNOLOGÍA DIAGNÓSTICA

Antes de realizar una investigación epidemiológica es fundamental determinar la capacidad que tienen las pruebas para medir el evento de interés. Las pruebas diagnósticas son el soporte para el personal de salud a la hora de tomar decisiones frente a las personas ya sea para el diagnóstico pronóstico o seguimiento, por lo tanto una característica de éstas debe ser su capacidad para discriminar entre pacientes con diagnóstico y sin diagnóstico con lo que se controlan los sesgos en la clasificación de los pacientes^{15 16}.

Durante el desarrollo de la temática se usa el término “estándar de oro” o “prueba de referencia” por lo que brevemente se explica la definición de ésta expresión. El vocablo proviene del inglés “*gold estándar*” y hace alusión a la prueba diagnóstica que hasta el momento ha demostrado tener la mejor capacidad para discriminar entre sujetos con diagnóstico y sin diagnóstico¹⁷.

Aunque se asume que el estándar de oro es un reflejo fiel de la propiedad a medir, dicha validez no es perfecta, ya que clasificar la condición de sano o enfermo no es fácil cuando el espectro de la enfermedad es amplio y abarca etapas tempranas y graves o avanzadas de ella. Por consiguiente, aquí se hace referencia al estándar de oro a la prueba que al momento de realizar el estudio ha mostrado los mejores resultados de reproducibilidad¹⁸.

¹⁵ Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM, et al. Towards complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: The STARD Initiative. *Ann Intern Med.* 2003;138(1): 40-4.

¹⁶ Herrera P, Duffau G. Pruebas diagnósticas: algunos aspectos cuantitativos para su desarrollo e interpretación. *Rev Chil Pediatr.* 1995; 66 (6): 335-40.

¹⁷ Ochoa C, Orejas G. Epidemiología y metodología científica aplicada a la pediatría (IV): Pruebas diagnósticas. *An Esp Pediatr.* 1999; 50: 301-14.

¹⁸ Rutjes AW, Reitsma JB, Coomarasamy A, Khan KS, Bossuyt PM. Evaluation of diagnostic tests when there is no gold standard. A review of methods. *Health Technol Assess.* 2007;11(50): iii, ix-

2.1.1 Tipos de muestreo. Cuando se quiere realizar evaluación de tecnología diagnóstica es importante conocer el tipo de muestreo empleado para tal fin. Como lo cita Orozco en su libro, existen tres tipos de muestreo:

- Corte transversal o naturalístico: se caracteriza porque de manera independiente tanto la prueba que se busca evaluar como el estándar de oro se le realiza a todos los sujetos del estudio. Se utiliza cuando los costos permiten la ejecución de ambas pruebas¹⁹.
- Prospectivo: consiste en realizar inicialmente la prueba en evaluación a todos los sujetos del estudio y seguidamente, mediante un muestreo aleatorio, seleccionar una submuestra a la que se le realiza la prueba gold estándar. Es ideal en estudios donde el gold estándar es riesgoso por lo que resulta inviable la realización de la prueba a toda la muestra²⁰.
- Retrospectivo: el diagnóstico se realiza con el estándar de oro a todos los sujetos del estudio y posteriormente se aplica la prueba en evaluación a una submuestra seleccionada de manera aleatoria. Este diseño de muestreo es el recomendado en aquellos estudios donde la prueba que se va a evaluar es invasiva por lo que no es posible aplicarla a todos los sujetos de la muestra²¹.

Hay un tipo de muestreo adicional que se conoce como “pseudoretrospectivo” en el que se emplea un grupo de personas con el diagnóstico positivo y a otro grupo, que por lo general, se encuentra libre del evento o tiene un riesgo menor de presentar el evento que se desea evaluar; no obstante no es recomendada su

51.

¹⁹ Orozco L, Camargo D. Evaluación de tecnologías diagnósticas y tipos de muestreos. *Biomédica*, 1997;7: 321-4.

²⁰ *Ibíd.*

²¹ *Ibíd.*

utilización, ya que las estimaciones son sesgadas y por consiguiente inválidas, debido a que es improbable que la población libre del evento le llegue a ocurrir, es decir el riesgo de tener el evento es diferente entre los grupos que se comparan²².

2.1.2 Fases de estudios de tecnología diagnóstica. Por otra parte es indispensable contextualizar el diseño de la validación según la fase en la que se ejecute. Hay cuatro fases:

- Fase I: o fase exploratoria; corresponde a un estudio preliminar de validación retrospectiva, transversal o de casos y controles, donde se busca determinar que los resultados del test son diferentes entre sujetos sanos y enfermos²³.

En esta fase se instaura el protocolo de la prueba y se establece la capacidad discriminadora de la misma. Para tener los valores de la prueba en cada uno de los grupos se recurre a una muestra de individuos sanos y una con sujetos que tengan el diagnóstico positivo, por consiguiente el muestreo pseudoretrospectivo resulta ser útil²⁴.

Orozco recomienda que el muestreo llevado a cabo en sujetos sanos incluya individuos de todas las edades, ambos géneros y diferentes etnias. De igual manera, si el estudio se ejecuta en personas con el diagnóstico, que el espectro del mismo esté representado en dicha muestra²⁵.

- Fase II: corresponde a la fase en la que se establece la validación de criterio de la prueba. Se deben incluir personas sospechosas de presentar el diagnóstico, por consiguiente el muestreo de tipo pseudoretrospectivo no debe ser

²² Orozco LC 2010. Fases y Muestreos, o de cómo tomar las personas de una población para hacer el estudio. En: *Medición en Salud Diagnóstico y Evaluación de Resultados Un manual crítico más allá de lo básico*. Bucaramanga: División de publicaciones UIS; 2010. p 63 – 72.

²³ Carnero-Pardo C. Evaluación de las pruebas diagnósticas. *Rev Neurol*. 2005; 40 (11): 641-3.

²⁴ *Ibíd.*

²⁵ *Ibíd.*

empleado. Se recomienda entonces los muestreos prospectivo y retrospectivo cuando la prevalencia del evento a evaluar es menor al 20% y de corte transversal cuando la prevalencia es superior al 20%. Los estudios en esta fase esperan diferenciar entre sanos y enfermos, por consiguiente son útiles para establecer la capacidad discriminativa del test²⁶.

- Fase III: se trata de una validación prospectiva que se realiza con individuos que se encuentran libres del evento que se desea evaluar. Los sujetos se siguen durante un tiempo establecido y mediante un Ensayo Clínico Controlado (ECC) se evalúa la presencia o no del diagnóstico: a una parte de la muestra se le realiza la prueba y a la otra no. Este diseño determina la capacidad predictiva del test²⁷.
- Fase IV: se encuentran aquí todos los estudios que evalúan el impacto y la utilidad del test, por lo que éste debe ser comparado con la prueba estándar de oro bajo el diseño de un ensayo clínico controlado, con asignación aleatoria de los individuos en los grupos²⁸.

Orozco resume las fases de muestreo en tres: la **primera fase** es la inicial de estandarización y discriminación general; la **segunda fase** corresponde a la evaluación en la población en la que será utilizado el test; la **tercera fase** es la de evaluación de la utilidad y vigilancia posmercado²⁹.

La variabilidad en los resultados obtenidos al aplicar un test diagnóstico puede ser propia de la condición biológica del paciente y del componente bioquímico que se desea medir, características en sí de la prueba que hacen que la lectura de la misma no sea sencilla de interpretar para distinguir entre diagnosticado y no

²⁶ Ibíd.

²⁷ Ibíd.

²⁸ Carnero-Pardo C. Evaluación de las pruebas diagnósticas. Rev Neurol. 2005; 40 (11): 641-3.

²⁹ Orozco LC 2010. Fases y Muestreos, o de cómo tomar las personas de una población para hacer el estudio. En: Medición en Salud Diagnóstico y Evaluación de Resultados Un manual crítico más allá de lo básico. Bucaramanga: División de publicaciones UIS; 2010. p 63-72.

diagnosticado o inherentes al observador, quien termina por interpretar lo que cree ver y no lo que realmente ve ya sea por falta de experiencia en la lectura de un resultado o porque está sesgado ante el diagnóstico y el cuadro clínico del paciente. No obstante, en el laboratorio la calidad de la medición efectuada por una prueba diagnóstica se verifica mediante sus propiedades de confiabilidad y validez³⁰.

2.1.3 Confiabilidad de pruebas diagnósticas. La confiabilidad es la característica que se da cuando al aplicar más de una vez un mismo instrumento de medición el resultado de la medición sigue clasificando al paciente sano como sano y al paciente enfermo como enfermo y se constituye en una cualidad fundamental en una prueba diagnóstica. Cuando se dice que una prueba tiene buena reproducibilidad se entiende que la prueba alcanza un nivel en el que es posible diferenciar en un grupo de sujetos cuáles tienen la condición en estudio y cuáles están libres de ella; así, esta característica no depende exclusivamente del instrumento de medición sino de la variabilidad que tiene el evento en estudio en la población en donde se quiere efectuar la medición³¹.

La confiabilidad involucra tres conceptos que son:

Consistencia interna: grado en que las preguntas de un cuestionario ó un instrumento de medición pertenecen a un constructo unidimensional. De esta manera las puntuaciones serán similares si las preguntas representan una misma dimensión de dicho constructo. La determinación de este coeficiente se realiza con el alpha de Cronbach, que toma valores entre cero y uno o el coeficiente de Kuder-Richardson KR-20.

³⁰ Latour J, Abaira V, Cabello JB, Lopez SJ. Investigation methods in clinical cardiology. IV. Clinical measurements in cardiology: validity and errors of measurements. Rev Esp Cardiol, 1997; 50(2): 117-28.

³¹ Orozco LC 2010. Confiabilidad o de la consistencia, reproducibilidad, acuerdo y algo más. En: Medición en Salud Diagnóstico y Evaluación de Resultados Un manual crítico más allá de lo básico. Bucaramanga: División de publicaciones UIS; 2010. p 73-103.

- **Acuerdo o concordancia:** Procedimiento que evalúa las diferencias entre los datos obtenidos a partir de dos mediciones. El procedimiento más usado para establecer la concordancia es el Límite de acuerdo de Bland y Altman que consiste en una representación gráfica de la diferencia de las mediciones (eje de las ordenadas) y el promedio (eje de las abscisas) obtenido tras realizar dos mediciones de una misma característica. Se reporta con las mismas unidades en que los datos fueron obtenidos³².

La gráfica se construye ubicando el promedio de las dos medidas en el eje X y la diferencia de éstas en el eje Y. El límite de acuerdo del 95% está dado por $\pm 1,96$ veces la desviación estándar de la diferencia de dichas mediciones. Cuando la diferencia de las mediciones no presenta sesgo el valor se acerca a cero y los datos se encuentran muy juntos dentro de los límites de acuerdo³³.

Reproducibilidad: característica determinada al realizar dos o más veces la misma prueba para establecer un diagnóstico. Es un reflejo de la estabilidad que presentan los resultados cuando la prueba se realiza en condiciones similares. La determinación de la reproducibilidad dependerá de la escala de medición de la variable, el número de evaluadores y el tipo de muestreo. Es indispensable que las pruebas se ejecuten con el desconocimiento de los resultados encontrados con las demás pruebas que ya se han hecho³⁴.

Subtipos de reproducibilidad

³² Orozco LC 2010. Confiabilidad o de la consistencia, reproducibilidad, acuerdo y algo más. En: *Medición en Salud Diagnóstico y Evaluación de Resultados Un manual crítico más allá de lo básico*. Bucaramanga: División de publicaciones UIS; 2010. p 73-103.

³³ *Ibíd.*

³⁴ *Ibíd.*

- **Interobservador:** cuando los datos han sido obtenidos por más de un observador y se hace indispensable determinar la variabilidad de las mediciones entre éstos al realizar la medición en un mismo sujeto³⁵.
- **Intraobservador:** en el caso que un mismo observador realiza la medición más de una vez en diferentes momentos de tiempo sobre un mismo sujeto³⁶.
- **Entre métodos:** cuando hay más de un instrumento de medida para un mismo evento y el objetivo es determinar que tanto se corresponden el uno con el otro³⁷.
- **Prueba- re prueba:** consiste en administrar de forma repetida un mismo instrumento en una misma persona en dos momentos de tiempo diferentes y establecer la consistencia tras la aplicación repetida de la prueba³⁸.

La reproducibilidad de una prueba puede ser medida a través de:

- **Coefficiente de Correlación Intraclass (CCI):** es utilizado cuando hay dos o más variables continuas. Representa la proporción de variabilidad total debida a la variación entre los individuos al promediar la correlación entre todos los pares de observaciones en distinto orden y ajusta por el azar³⁹.

La obtención del CCI se hace con ANOVA de una vía, si se quiere encontrar la variabilidad entre y dentro de las mediciones; o de dos vías si se desea establecer

³⁵ Ibíd.

³⁶ Ibíd.

³⁷ Ibíd.

³⁸ Latour J, Abaira V, Cabello JB, Lopez SJ. Investigation methods in clinical cardiology. IV. Clinical measurements in cardiology: validity and errors of measurements. Rev Esp Cardiol, 1997; 50 (2): 117-28.

³⁹ Shrout P, Fleiss J. Intraclass Correlations: uses in assessing rater reliability. Psychol Bull. 1979; 86 (2): 420-8.

la variabilidad entre los cuadrados medios en los residuales de las mediciones. La determinación del CCI se fundamenta en la “descomposición de la variabilidad de los datos” por consiguiente para obtener valores altos es indispensable que la muestra sea heterogénea por lo que se requiere que la selección de los participantes del estudio sea aleatorizada. No obstante la aleatorización no garantiza la variabilidad. El valor del CCI adopta valores entre 0 y 1, si la reproducibilidad es perfecta el valor de CCI será igual a uno⁴⁰. Para efectos de su interpretación se tiene en cuenta que valores menores de 0,2 indican un CCI pobre y 1 es un CCI perfecto⁴¹, tal como se usa para la interpretación de Kappa (tabla 1).

Existen diferentes versiones de CCI y la utilización de cada una de ellas depende de la metodología del estudio empleada, por consiguiente, es posible obtener resultados diferentes con un mismo grupo de datos. Por tal motivo, es importante establecer cuál es el CCI más conveniente determinar⁴².

Para establecer cuál es el CCI más adecuado, Shrout y Fleiss proponen una serie de preguntas como sigue:

1. ¿El análisis de varianza (ANOVA) que se desea aplicar es de una vía o de dos vías? En el caso del análisis de una vía, la varianza se puede descomponer entre y dentro de las mediciones. El análisis de dos vías muestra la variabilidad entre los jueces.
2. ¿El CCI a emplear requiere un modelo de efectos aleatorios o mixtos? Se habla de efectos aleatorios cuando la prueba se realiza más de dos veces o por más de dos jueces. Los efectos mixtos implican que los jueces son fijos, no obstante este

⁴⁰ Orozco LC 2010. Confiabilidad o de la consistencia, reproducibilidad, acuerdo y algo más. En: *Medición en Salud Diagnóstico y Evaluación de Resultados Un manual crítico más allá de lo básico*. Bucaramanga: División de publicaciones UIS; 2010. p 73-103.

⁴¹ *Ibíd.*

⁴² Deyo RA, Diehr P, Patrick DL. Reproducibility and responsiveness of health status measures. *Statistics and strategies for evaluation. Control Clin Trials*. 1991;12: 142S - 158S.

último modelo es muy poco utilizado dado que no tiene sentido evaluar solamente la reproducibilidad de los calificadores.

3. ¿La unidad de análisis es un puntaje individual o es un promedio de múltiples puntajes?

De esta manera se pueden obtener los siguientes tipos de CCI: (1,1) cuando lo ideal es ANOVA de una vía, (2,1) para ANOVA de dos vías si se combinan todos los datos para el análisis y los jueces son seleccionados de manera aleatoria, y (3,1) si el ANOVA es de dos vías en un modelo mixto con evaluadores fijos⁴³.

Orozco sugiere que los coeficientes que deben ser reportados en estudios de reproducibilidad son CCI (2,1) que representa la reproducibilidad de un número de evaluadores que constituyen una muestra aleatoria de los posibles evaluadores y el CCI (2, k) que constituye el promedio de mediciones repetidas efectuadas por los mismos jueces⁴⁴.

Teniendo en cuenta que el fundamento del CCI está en la descomposición de la variabilidad, es importante tener presente que si los sujetos en quienes se aplicó la prueba son normales la variabilidad va a ser pequeña y los CCI serán bajos. Así mismo, en individuos con una alteración que presente gran variabilidad, los CCI serán altos y se podrá diferenciar con mayor facilidad entre las personas⁴⁵.

- **El índice Kappa:** corresponde a un coeficiente de correlación intraclassa que es ampliamente utilizado cuando se tienen variables dicotómicas; su valor va desde cero cuando no hay acuerdo a 1 cuando hay acuerdo perfecto (Tabla 3). Este índice representa la concordancia que está dada más allá del azar^{46 47}.

⁴³ Deyo RA, Diehr P, Patrick DL. Reproducibility and responsiveness of health status measures. Statistics and strategies for evaluation. Control Clin Trials. 1991;12: 142S - 158S.

⁴⁴ Orozco LC 2010. Confiabilidad o de la consistencia, reproducibilidad, acuerdo y algo más. En: Medición en Salud Diagnóstico y Evaluación de Resultados Un manual crítico más allá de lo básico. Bucaramanga: División de publicaciones UIS; 2010. p 73-103.

⁴⁵ Ibíd.

⁴⁶ Kraemer H, Periyakoil VS, Noda A. Kappa coefficients in medical research. Stat Med 2002; 21(14): 2109-29.

Algunos autores han propuesto varias interpretaciones a los valores Kappa, entre éstos se encuentra Seigel y su grupo de colaboradores, quienes proponen la escala que se presenta en la Tabla 1⁴⁸.

El kappa es calculado por el cociente entre la concordancia observada menos la esperada por el azar sobre uno menos la concordancia posible no debida al azar⁴⁹.

Tabla 1. Interpretación del valor del coeficiente Kappa

VALOR DE KAPPA	NIVEL DE REPRODUCIBILIDAD
0,81 - 1,00	Perfecto
0,61 - 0,80	Sustancial
0,41 - 0,60	Moderado
0,21 - 0,40	Ligera
< 0,20	Pobre

Fuente: Seigel D, Podgor M, Remaley A. Am J Epidemiol.1992; 135 (5): 571- 8.

- **El Coeficiente de Correlación de Pearson** ha sido empleado para evaluar reproducibilidad cuando se tienen variables continuas una de las cuales presenta una distribución normal y hay dos observaciones ya sea dos instrumentos o dos evaluadores. Sin embargo, este coeficiente no es una buena representación de reproducibilidad ya que lo que realmente mide es asociación de las mediciones⁵⁰.

⁴⁷ Cortés E, Rubio JA, Gaitán H. Métodos estadísticos de evaluación de la concordancia y la reproducibilidad de pruebas diagnósticas. Rev Colomb Obstet Ginecol. 2010; 61(3): 247-55.

⁴⁸ Seigel D, Podgor M, Remaley A. Acceptable values of kappa for comparison of two groups. Am J Epidemiol.1992; 135 (5): 571-8.

⁴⁹ Ibíd.

⁵⁰ Orozco LC 2010. Confiabilidad o de la consistencia, reproducibilidad, acuerdo y algo más. En: Medición en Salud Diagnóstico y Evaluación de Resultados Un manual crítico más allá de lo básico. Bucaramanga: División de publicaciones UIS; 2010. p 73-103.

2.1.4 Validez. El término validez deriva del latín *validus* y se define como la capacidad que tiene un procedimiento de medir aquello para lo que fue diseñado⁵¹. Puede ser revisada desde tres enfoques diferentes como se presenta a continuación.

2.1.4.1 Validación aparente o facial Busca evaluar si cada uno de los ítems que contiene una escala o hacen parte de un test están relacionados con la propiedad que se quiere medir⁵².

2.1.4.2 Validación de contenido. Determina el grado en que el grupo de ítems reúne todos los aspectos de la característica que se mide⁵³.

2.1.4.3 Validación de constructo Es una conceptualización de algo que no es posible observar directamente por lo que se recurre a teorías que explican y dan sentido a los datos. Ejemplo de esto son el estrés y la depresión, entre otros^{54 55}.

2.1.4.4 Validación de criterio. Nivel en el que el resultado obtenido por la prueba que se quiere evaluar, se acerca al alcanzado con el patrón de referencia⁵⁶. La validación de criterio es concurrente si la comparación entre la prueba y el referente se realiza de manera casi simultánea y predictiva si la comparación se lleva a cabo a futuro⁵⁷.

⁵¹ Kendell R, Jablensky A. Distinguishing Between the Validity and Utility of Psychiatric Diagnoses. *Am J Psychiatry*. 2003; 160 : 4-12.

⁵² Latour J, Abaira V, Cabello JB, Lopez SJ. Investigation methods in clinical cardiology. IV. Clinical measurements in cardiology: validity and errors of measurements. *Rev Esp Cardiol*. 1997; 50(2): 117-28.

⁵³ *Ibíd.*

⁵⁴ Streiner DL, Norman GR. Validity. *Health Measurement Scales. A Practical Guide to Their Development and Use*. New York: Oxford University Press; 2008. p 247-276.

⁵⁵ *Ibíd.*

⁵⁶ Domhldt E. *Methodological Research. Physical Research Therapy. Principles and Applications*. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1993. p 162 -171.

⁵⁷ *Ibíd.*

Para conocer la calidad diagnóstica del test, las características de la validez de criterio pueden ser determinadas a través de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo^{58 59}.

- La **sensibilidad** (S) es la probabilidad de llegar a tener un resultado positivo en la prueba dado que el paciente tiene un diagnóstico *positivo*^{60 61}.
- La **especificidad** (E) es la capacidad de la prueba de clasificar como negativos a los individuos que están sanos^{62 63}.

En términos de pruebas serológicas la S es entendida como la mínima cantidad detectable del metabolito en cuestión, y la E corresponde al grado de en que la prueba no presenta reacción cruzada con otros metabolitos⁶⁴.

- El **Valor Predictivo Positivo** (VPP) hace referencia al grado en que la proporción de individuos que obtuvieron un resultado positivo en la prueba tienen en realidad un diagnóstico positivo⁶⁵.
- El **Valor Predictivo Negativo** (VPN) corresponde al grado en que la proporción de individuos con un resultado negativo en la prueba están realmente libres del evento⁶⁶.

⁵⁸ Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. Clin Chem. 1993; 39(4): 561-77.

⁵⁹ Orozco LC 2010. Validación de criterio o de la sensibilidad específica para predecir la calidad de las probabilidades. En: Medición en Salud Diagnóstico y Evaluación de Resultados Un manual crítico más allá de lo básico. Bucaramanga: División de publicaciones UIS; 2010. p 115-57.

⁶⁰ Kraemer H. Sensitivity and Specificity: The Signal Detection Approach. Evaluating medical test: Objective and Quantitative Guidelines. 1th ed. California: Sage Publications; 1992. P 63 – 94.

⁶¹ Ibíd.

⁶² Ibíd.

⁶³ Ibíd.

⁶⁴ Jacobson RH. Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. Rev Sci Tech. 1998; 17 (2): 469-526.

⁶⁵ Orozco LC 2010. Validación de criterio o de la sensibilidad específica para predecir la calidad de las probabilidades. En: Medición en Salud Diagnóstico y Evaluación de Resultados Un manual crítico más allá de lo básico. Bucaramanga: División de publicaciones UIS; 2010. p 115-57.

La relación entre la sensibilidad y la especificidad pueden ser apreciados gráficamente a través de la Curva del Operador Receptor (ROC), que representa la *probabilidad de clasificar correctamente a los sujetos del estudio como sanos o enfermos* siempre y cuando la medición sea continua u ordinal^{67 68}.

2.2 GENERALIDADES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La enfermedad de Chagas hace parte del grupo de enfermedades catalogadas por la Organización Mundial de la Salud como “*desatendidas*”, es decir que reciben escasa atención ya que los afectados son la población pobre que carece de autoridad y poder político⁶⁹.

El agente causal es el parásito tisular *Trypanosoma cruzi*, que puede infectar al hombre y a otros mamíferos por diferentes mecanismos dentro de los que se destacan: la transmisión vectorial, que ocurre cuando las heces de triatomíneos portadores de tripomastigotes de *T. cruzi* entran en contacto con piel lacerada o mucosas; la transmisión transfusional de los componentes sanguíneos; la transmisión vertical; y la transmisión oral⁷⁰.

2.3 AGENTE CAUSAL DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

El parásito fue descubierto en el año 1909 en Brasil por el médico Carlos Chagas. El reconocimiento de los insectos hematófagos conocidos, en ese entonces como

⁶⁶ Kraemer H. Predictive Value: The Bayesian approach, Risk ratios and Odds ratios. Evaluating medical test: Objective and Quantitative Guidelines. 1th ed. California: Sage Publications; 1992. p 96-113.

⁶⁷ Delacour H, Servonnet A, Perrot A, Vigezzi JF, Ramírez JM. ROC (receiver operating characteristics) curve: principles and application in biology. Ann Biol Clin (París). 2005; 63(2): 145-54.

⁶⁸ Burgueño MJ, García-Bastos JL, González-Buitrago JM. Las curvas ROC en la evaluación de las pruebas diagnósticas. Med Clin (Barc). 1995; 104 (17): 661-70.

⁶⁹ OMS/OPS. Consulta técnica sobre información educación y comunicación (IEC) en enfermedad de Chagas congénita. CLAP, Montevideo, Uruguay, 17 y 18 de mayo de 2007.

⁷⁰ Toso A, Vial F, Galanti N. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. Rev. Med. Chile. 2011; 139 (2): 258-66.

“barbeiros”, se efectuó al examinar el contenido intestinal de éstos donde observó formas flagelares características. El ciclo biológico completo del parásito pudo replicarse en monos *Calletox penicillata*^{71 72}.

T. cruzi es un hemoprotozoario phylum sarcomastigophora, subphylum mastogophorea, orden kinetoplastida, suborden Trypanosomatina, familia Trypanosomatidae, género *Trypanosoma*⁷³.

Su ciclo de vida comprende cuatro estadios morfológicos:

- Tripomastigote: se puede encontrar de dos maneras, **tripomastigote metacíclico** que es la forma que ingresa al huésped y está presente en el contenido intestinal del vector; **tripomastigote sanguíneo** que se encuentra en la circulación del huésped y aunque no se replica puede infectar las células. Presenta núcleo, kinetoplasto y membrana ondulante. El tamaño de ésta forma parasitaria es de 20 a 25 micras (μm)^{74 75}.
- Epimastigote: realiza división binaria longitudinal. Mide de 20 a 40 μm de largo por 2 μm de ancho, presenta núcleo, kinetoplasto y una membrana ondulante de la que emerge un único flagelo del extremo anterior⁷⁶.
- Amastigote: forma en la que está ausente el flagelo, es intracelular y se replica por división binaria simple dentro de macrófagos y células fagocíticas del huésped. Mide de 2 a 4 μm de diámetro⁷⁷.

⁷¹ Ruiz J. Historia de la enfermedad de Chagas. Gac Med Bol. 2007; 30 (2): 70-3.

⁷² Lorenzano C. La enfermedad de Chagas-Mazza, un mal latinoamericano. Revista Investigación y desarrollo. 1996; 5: 1-16.

⁷³ Molina Z, Rosales J, Galaviz L, Molina D. Prevalencia de *Trypanosoma cruzi* en triatomos silvestres de Nuevo León, México. Salud Pública Mex, 2007; 49 (1):37-44.

⁷⁴ Suárez N, Cabrera R, Cartagena L, Ayaqui R. Características biológicas de una cepa de *Trypanosoma cruzi* en un modelo murino y análisis de supervivencia. Rev Perú Med Exp Salud Pública. 2009; 26 (2): 187-92.

⁷⁵ Guzmán E, Zavala J, Acosta K, Rosado M. Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*. Rev Biomed 1999; 10: 177- 84.

⁷⁶ Ibíd.

⁷⁷ Ibíd.

Para que la infección se establezca, el parásito debe anclarse mediante las glicoproteínas gpS2 y gp9 a receptores de ácido siálico presentes en la membrana de la célula blanco e incorporarse dentro de ésta a través de una vacuola parasitófora la que abandona haciendo uso de la toxina TC-TOX y puede generar la infección ya sea por inducción de apoptosis o inhibir la respiración del fagocito⁷⁸.

La respuesta inmune del huésped ante la presencia del *T. cruzi*, está dada por las células mononucleares que incrementan sus niveles de interleucina 4 e interferón gama lo que a su vez induce la respuesta de tipo TH1 que estimula la producción de anticuerpos inmunoglobulina M (IgM) e inmunoglobulina G (IgG) que van dirigidas contra diferentes determinantes antigénicos del parásito⁷⁹.

2.4 DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN CON *Trypanosoma cruzi*

El diagnóstico de la infección se puede evaluar en dos momentos: la fase crónica o indeterminada donde los métodos serológicos son empleados para establecer la presencia de anticuerpos circulantes en sangre que demuestran, de manera indirecta, el contacto previo con los parásitos; y la fase aguda en la que los métodos parasitológicos permiten observar las formas flagelares de *T. cruzi* que se encuentran en circulación⁸⁰.

2.4.1 Pruebas serológicas para el diagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi*. Las pruebas serológicas se fundamentan en la detección de anticuerpos generados por la exposición previa al *T.cruzi*.

⁷⁸ Palau M. Relación hospedero-parásito *Trypanosoma cruzi*. Revista MVZ-Córdoba 2000; 5 (1): 33-7.

⁷⁹ Montiel G, Díaz G. Respuesta inmune de las células del hospedero a la infección por *Trypanosoma cruzi*. Rev méd Hosp Nac Niños. 2002; 37: 1-2.

⁸⁰ Anthony R, Johnson C, Sousa O. Use of micro-ELISA for quantitating antibody to *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. Am J Trop Hyg. 1979; 28 (6): 969-73.

Estudios experimentales en modelos animales demuestran la actividad inmune que desempeñan los linfocitos B en la producción de anticuerpos para contrarrestar la infección aguda por *T. cruzi*⁸¹. Esta respuesta inmune de tipo humoral es la encargada de delimitar la acción del parásito en el organismo; por otro lado el parásito desencadena la inhibición de la interleucina 2 (IL-2) con lo que se suprime la producción de células T. Por consiguiente la detección y cuantificación de anticuerpos tipo Inmunoglobulina M (IgM) o Inmunoglobulina G (IgG) son un elemento clave para el diagnóstico de la infección⁸².

2.4.1.1 Fijación de complemento (FC). Es la primera prueba que se usó para la detección de anticuerpos anti *T. cruzi*. Se fundamenta en la detección de complejos inmunes formados tras la lesión de la membrana celular. La lisis de los eritrocitos es evidencia de que el complemento no se fijó al complejo antígeno anticuerpo y por consiguiente no hay anticuerpos presentes en la muestra analizada^{83,84}.

Camargo y colaboradores, mediante muestreo transversal, obtuvieron 3624 sueros de sujetos procedentes de dos zonas endémicas para Chagas en Brasil y usaron como antígeno una cepa local de *T. cruzi*. Este estudio mostró una concordancia entre la fijación de complemento, la Hemaglutinación Indirecta (HAI) y la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) de 97%; además la FC obtuvo una sensibilidad de 99,22% y una especificidad de 99,92% al compararse frente a HAI e IFI empleadas como pruebas de referencia⁸⁵.

⁸¹ Rodriguez AM, Santoro F, Afchain D, Bazin, Capron A. *Trypanosoma cruzi* infection in B- Cell-deficient rats. Infect Immun. 1981; 31 (2): 524-9.

⁸² De Meis J, Morrot A, Farias-de-Oliveira DA, Villa-Verde DM, Savino W. Differential regional immune response in Chagas disease. PLoS Negl Trop Dis. 2009; 3(7): e417.

⁸³ Abbas A, Lichtman A, Pober J. Inmunología celular y molecular. Capítulo XV: El sistema de complemento. Editorial Interamericana McGraw-Hill. 1999. p 349-70.

⁸⁴ Camargo M. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American Trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. Rev Inst Med Trop. 1966; 8 (5): 227-34.

⁸⁵ Ibíd.

Un estudio realizado con 42 pacientes: 11 con diagnóstico de infección en fase aguda y 31 en fase crónica de zona endémica de Brasil, dejó ver que la sensibilidad de la FC fue de 27% en pacientes en fase aguda (gold estándar xenodiagnóstico y extendido de sangre periférica) y de 78% para pacientes en fase crónica (gold estándar ELISA e IFI). La especificidad del ELISA fue de 98,2% y de 100% para IFI y FC⁸⁶. No obstante, estos hallazgos de sensibilidad y especificidad no son válidos ya que hay varias falencias, una de ellas fue el empleo un muestreo pseudoretrospectivo, en donde fue utilizado como “control” por un lado un grupo de 30 estudiantes provenientes de zona no endémica y por consiguiente con un riesgo de infección mucho más bajo que el grupo de estudio⁸⁷.

2.4.1.2 Hemaglutinación Indirecta (HAI). El fundamento de la prueba consiste en hacer reaccionar el suero que contiene los anticuerpos con anti-*Trypanosoma cruzi* con el antígeno. La aglutinación ocurre cuando células recubiertas por partículas antigénicas solubles reaccionan con los anticuerpos presentes en la muestra a analizar. En las muestras positivas se observa una malla irregular producto de aglutinación tras la reacción antígeno-anticuerpo⁸⁸.

Kagan y colaboradores compararon la hemaglutinación indirecta frente la fijación de complemento mediante el empleo de 150 sueros procedentes de pacientes de zona endémica en México; el acuerdo entre las dos pruebas fue de 81%. En ese estudio la sensibilidad de la HAI fue de 86% y la especificidad del 73% comparado con FC; el kappa de la HAI vs FC en muestras de suero fue de 0,99. Esta técnica ha logrado ser estandarizada para el procesamiento tanto de muestras de suero como de eluidos sanguíneos lo que la convierte en una buena elección al

⁸⁶ Schattschneider W, Lopes ER, De Alencar JE, Bienzle U, Feldmeier. A comparative study of four serological methods for diagnosis of acute and chronic Chagas disease in Brazilian patients. Trop Geogr Med. 1992; 44: 210 -18.

⁸⁷ Orozco L, Camargo D. Evaluación de tecnologías diagnósticas y tipos de muestreos. Biomédica, 1997;7: 321-4.

⁸⁸ Aguilar V. Reacciones de aglutinación. Gac Méd Méx. 2004; 140 (3): 50-52.

momento de realizar diagnóstico de infección en zonas de difícil acceso. En este mismo estudio se determinó una reproducibilidad de 77% en los títulos de la HAI en sueros y eluidos⁸⁹.

En un estudio de corte transversal realizado (Zicker y cols., 1990) con 6222 sujetos procedentes de zona urbana del centro de Brasil para comparar la sensibilidad y especificidad de los eluidos sanguíneos frente a sueros, se obtuvo una sensibilidad de 67% y especificidad de 99,9% para la HAI comparado con la IFI y el ELISA, asumiendo como verdaderos positivos o negativos las muestras que tenían el mismo resultado para las tres técnicas ensayadas. Si se tenía en cuenta el resultado del eluido entre las pruebas de ELISA y HAI los resultados fueron: S: 86,73%; E: 95,83%; VPP: 64%; VPN: 98,83%. Entre HAI y ELISA fue: S: 86,73%; E: 95,83%; VPP: 64%; VPN: 98,83%⁹⁰. El estudio de Zicker et al, fue realizado con un muestreo transversal y un buen tamaño de muestra por lo que los hallazgos mencionados anteriormente son válidos y permiten conocer las características de las pruebas serológicas ELISA, IFI y HAI, para una población que vive en zona urbana de Brasil. No obstante el estudio no reportó datos de reproducibilidad.

2.4.1.3 Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). La técnica de IFI emplea parásitos completos en estadio de epimastigotes obtenidos a partir de un cultivo in vitro de siete días; los parásitos se fijan por medio de calor a un pozo en una lámina portaobjetos. Tras la adición del suero que contienen anticuerpos anti *T. cruzi*, se forma un complejo antígeno anticuerpo que se visualiza, por la acción de la

⁸⁹ Kagan G, Goldsmith RS, Zárata R, Allain D. Evaluación de pruebas serológicas utilizadas para estudiar la enfermedad de Chagas. PAHO Bull.1978; 12(4): 341- 48.

⁹⁰ Zicker F, Smith PG, Luquetti AO, Oliveira OS. Mass screening for *Trypanosoma cruzi* infections using the inmunofluorescence, ELISA and haemagglutination tests on serum samples and on blood eluates from filter- paper. Bull World Health Organ. 1990; 68 (4): 465-71.

fluoresceína presente en el conjugado, en el microscopio de luz ultravioleta con una fluorescencia verde amarilla⁹¹.

Para evaluar la técnica de IFI, Sadun y colaboradores emplearon sueros de individuos con diagnóstico parasitológico de Chagas, sueros de donantes voluntarios y pacientes con otras tripanosomiasis. Encontraron una sensibilidad de 91,67%. Para evaluar la especificidad, fueron empleados sueros procedentes de ratones inoculados con *Trypanosoma brucei rhodesiense* y *T. b. gambiense*, la cual fue de 98,78%⁹². Aunque estos hallazgos hablan bien de la IFI para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*, no son válidos, ya que el tipo de muestreo empleado fue pseudoretrospectivo⁹³. Este estudio no reportó datos de reproducibilidad.

Fife y colaboradores encontraron que la IFI tenía una alta sensibilidad (98%) comparada con la fijación de complemento (gold estándar) en muestras de suero de pacientes con diagnóstico clínico de Chagas⁹⁴. Estos datos de sensibilidad y especificidad no pueden ser considerados como válidos ya que se empleó un muestreo pseudoretrospectivo: el diagnóstico de infección estuvo dado por pruebas parasitológicas solo en el grupo de enfermos⁹⁵. Además no se analizó la reproducibilidad de las pruebas.

Por otra parte, Ross y Novoa evaluaron la concordancia entre tres laboratorios al analizar 48 muestras de suero de pacientes de zona endémica de Venezuela mediante el empleo del ELISA, IFI y HAI; no encontraron discrepancias en los

⁹¹ Girola R, Wynne G, Mili A. La reacción de inmunofluorescencia en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas-Mazza. Bol Oficina Sanit Panam. 1968: 130-36.

⁹² Sadun EH, Duxbury RE, Williams JS, Anderson RI. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of African and American tripanosomiasis in Man. J Parasitol. 1963; 49 (3): 385-88.

⁹³ Orozco L, Camargo D. Evaluación de tecnologías diagnósticas y tipos de muestreos. Biomédica, 1997;7: 321-4.

⁹⁴ Fife E, Muschel L. Fluorescent- Antibody Technic for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. Am Soc of Trop Med and Hyg. 1959; 101: 540-43.

⁹⁵ Ibíd.

resultados obtenidos por IFI en los laboratorios participantes pero si entre ELISA y HAI⁹⁶. Sin embargo, los autores no refieren el tipo de concordancia que usaron para realizar dicha evaluación, lo que dificulta la interpretación adecuada de dichos resultados.

Investigadores como Evengard y Linder han demostrado además la utilidad de la Inmunofluorescencia para el diagnóstico mediante el empleo de eluidos sanguíneos. La técnica de colección de sangre en papel filtro es muy útil para el tamizaje de personas que viven en zonas endémicas de difícil acceso y distantes de los laboratorios donde se llevan a cabo las pruebas diagnósticas⁹⁷.

Para el diagnóstico de infección con Chagas, los eluidos sanguíneos han sido usados desde 1966 por Loureiro de Souza y Camargo, quienes encontraron una sensibilidad de 100% y especificidad de 97,2% de IFI frente a la FC⁹⁸. No obstante, no es claro el tipo de muestreo empleado, por lo tanto no es posible concluir la validez que tengan dichos hallazgos.

Al comparar la IFI con el ELISA se ha encontrado que ambas pruebas tienen excelentes características de sensibilidad y especificidad, no obstante no hay datos sobre reproducibilidad disponibles. En México, Monteón y colaboradores encontraron una sensibilidad de 100% y una especificidad de 98 a 100%; de igual manera para la IFI la sensibilidad y especificidad fueron de 100% y 95% respectivamente. Estos resultados carecen de validez por dos razones: la primera por que se utilizó un muestreo pseudoretrospectivo, la segunda por que fijaron la especificidad del ELISA teniendo en cuenta únicamente los resultados obtenidos con personas sanas. Aunque ambas pruebas resultaron ser muy buenas los autores recomiendan el empleo del ELISA ya que la interpretación de la misma

⁹⁶ Ross A, Novoa D. Comparability and reliability of ELISA, Immunofluorescence, and Indirect Hemagglutination assays for *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. JID. 1993; 168: 1581- 4.

⁹⁷ Evengard B & Linder E. Standardization of a filter-paper technique for blood sampling. Ann Trop Med Parasitol. 1988; 82 (3): 295-303.

⁹⁸ Loureiro de Souza S, Camargo M. The use of filter paper blood smears in a practical fluorescent test for american tripanosomiasis serodiagnosis. Rev Inst Med trop. 1966; 8: 255-58.

está inmersa en las mediciones de la absorbancia y su montaje no depende de equipos⁹⁹.

Aun así la IFI sigue siendo recomendada para el diagnóstico de la infección ya que ha demostrado ser muy útil en la determinación de la prevalencia de la infección en regiones endémicas, requiere un volumen mínimo de muestra y permite el procesamiento de varias muestras simultáneamente^{100 101}.

2.4.1.4 Inmunoensayo Ligado a una Enzima (ELISA). El “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (ELISA), fue descrito en 1971 por Eva Engvall y Peter Perlmann y específicamente empleado para la detección de anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi* por Voller¹⁰². Es una técnica serológica realizada en fase sólida que emplea una enzima que, previa adición de un sustrato enzimático, revela la formación del complejo antígeno-anticuerpo tras la aparición de un cambio de color^{103 104}.

El ELISA ha sido evaluado frente a IFI y FC. Spencer y colaboradores encontraron una sensibilidad y especificidad del ELISA frente a IFI y FC de 98,65% y 98,42% respectivamente, en individuos de El Salvador sin diagnóstico previo de infección. Al evaluarse de manera individual frente a IFI, los resultados fueron sensibilidad 89,19% y especificidad 97,89% y frente a FC fueron de 94,59% y 98,42%

⁹⁹ Monteon V, Sosa T, Reyes P. Serological test for American Trypanosomiasis a comparative study. Lat-amer Microbiol. 1989; 31: 35-8.

¹⁰⁰ Lorca M, Thiermann E. Valor diagnóstico de la inmunofluorescencia indirecta con anti-IgM para Enfermedad de Chagas, en adultos y recién nacidos Rev. Chile Pediatr 1982; 53: 199-203.

¹⁰¹ Camargo M. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American Trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. Rev Inst Med Trop. 1966; 8 (5): 227-34.

¹⁰² Voller A, Barlett A, Bidwell DE. Enzyme immunoassays for parasitic diseases. Tras Roy Soc Trop Med and Hyg. 1976; 70(2): 98-106.

¹⁰³ Guzmán E. Las pruebas de Elisa. Gac Méd Méx. 2004; 140 (3): 48-9.

¹⁰⁴ Petray P, Bonardello N, Clark R, Agranatti M, Corral R, Grinstein S. Evaluación del método de ELISA para detección de antígenos y complejos inmunes circulantes de *Trypanosoma cruzi* a través de un estudio de campo en una zona endémica de Argentina. Rev Inst Med Trop. 1992; 34(2): 141-47.

respectivamente¹⁰⁵. Sin embargo, estos hallazgos carecen de validez dado que fue utilizado un muestreo pseudoretrospectivo en la selección de sueros para evaluar las técnicas, y corresponde a grupos con diferente riesgo de infección¹⁰⁶.

En 1992 una casa comercial quiso evaluar un ensayo enzimático frente al IFI y HAI, éstos dos últimos emplean antígeno local. Para esto usaron un total de 1.392 muestras, entre las que incluyeron a pacientes con diferentes diagnósticos (leishmaniasis, schistosomiasis, toxoplasmosis, tuberculosis, lupus y sífilis) y provenientes de diferentes zonas geográficas (India, Brasil, Gambia Sudan y Estados Unidos). La concordancia de la prueba enzimática frente a la HAI fue de 97,38% y de 90,21% frente a la IFI; la sensibilidad fue de 97,89% frente a HAI e IFI¹⁰⁷. Como puede verse, la consecución de pacientes se realizó por muestreo pseudoretrospectivo, se incluyeron sujetos procedentes de diferentes zonas geográficas y por ende unos con más riesgo que otros para la infección con *T. cruzi*, lo que no produjo resultados válidos¹⁰⁸.

En Colombia investigadores quisieron determinar la capacidad discriminatoria de un ELISA casero frente a IFI. Determinaron una sensibilidad de 98,2% y especificidad de 98,96%¹⁰⁹. Este es quizá de los pocos estudios que han empleado un muestreo transversal, en forma independiente se realizó el diagnóstico y se aplicó la prueba que se deseaba evaluar. Por consiguiente los

¹⁰⁵ Ibíd.

¹⁰⁶ Orozco L, Camargo D. Evaluación de tecnologías diagnósticas y tipos de muestreos. *Biomédica*. 1997; 7: 321-4.

¹⁰⁷ Pan A, Rosenberg B, Hurley M, Schock G, Chu V, Aiyappa A. Clinical evaluation of an EIA for the sensitive and specific detection of serum antibody to *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease). *JID*. 1992; 165: 585-8.

¹⁰⁸ Orozco L, Camargo D. Evaluación de tecnologías diagnósticas y tipos de muestreos. *Biomédica*, 1997;7: 321-4.

¹⁰⁹ López M, Duque S, Orozco LC, Camargo D, Gualdrón L, Cáceres E, et al. Inmunodiagnóstico de la infección chagásica por ELISA. *Biomédica*. 1999; 19 (2): 159-63.

resultados son válidos y permiten ver que el ELISA se constituye en una prueba diagnóstica de calidad para la infección por *T. cruzi*¹¹⁰.

Tradicionalmente el ensayo contempla la utilización de proteínas de epimastigotes de *T. cruzi* como antígeno en la fase sólida¹¹¹; sin embargo, se han desarrollado técnicas que emplean proteínas específicas, lo que busca aumentar la especificidad manteniendo alta la sensibilidad del test¹¹².

- **Pruebas serológicas con antígenos recombinantes**

Aunque en las pruebas serológicas para Chagas puede existir reacción cruzada con infecciones causadas por otros tripanosomátidos como *Leishmania sp*, en lugares donde ambas parasitosis coexisten; autores como Guimarães y su equipo de trabajo demostraron que esta reacción no ocurre en el mismo grado ante los dos parásitos, por lo que la selección del punto de corte para el diagnóstico es clave para solventar este problema¹¹³ y por esta misma razón también han surgido pruebas serológicas con antígenos recombinantes.

Se han empleado proteínas específicas para el diagnóstico de infección chagásica; tal es el caso de la glicoproteína 90 y la fracción antigénica de 24 kilodaltons (Kd) conocida como antígeno C5-EP^{114 115}. Otros autores han

¹¹⁰ Orozco LC 2010. Confiabilidad o de la consistencia, reproducibilidad, acuerdo y algo más: En. Medición en Salud Diagnóstico y Evaluación de Resultados Un manual crítico más allá de lo básico. Bucaramanga: División de publicaciones UIS; 2010. p 73-103.

¹¹¹ Cannova D, Aguilar M, Pacheco M, Simona M, Medina M. Validación del Inmunoensayo enzimático (ELISA) y hemaglutinación indirecta (HAI) para el serodiagnóstico de la enfermedad e Chagas. *Salus*. 2002; 6: 4-9.

¹¹² Da Silveira J, Umezawa E, Luquetti A. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *TRENDS in Parasitology* 2001; 17(6): 286-91.

¹¹³ Guimarães MC, Celeste BJ, De Castilho EA, Mineo JR, Diniz JM. Immunoenzymatic assay (ELISA) in mucocutaneous leishmaniasis, Kala-azar, and Chagas disease: an epimastigote *Trypanosoma cruzi* antigen able to distinguish between anti-*Trypanosoma* and anti-*Leishmania* antibodies. *Am J Trop Med Hyg*. 1981; 30 (5): 942-7.

¹¹⁴ Schechter M, Voller A, Marinkelle CJ, Flint JE, Guhl F, Miles MA. Purified *Trypanosoma cruzi* specific glycoprotein for discriminative serological diagnosis of south American trypanosomiasis (Chagas disease). *Lancet*. 1983: 939 -41.

encontrado que el estrés nutricional y el proceso de esterilización en autoclave estimulan la expresión de ciertos antígenos específicos para Chagas, lo que los constituye en potenciales marcadores antigénicos de infección¹¹⁶. Así mismo se han producido antígenos recombinantes como el TcBCDE¹¹⁷. No obstante el empleo de muestreos de tipo pseudoretrospectivo no permite concluir de manera objetiva los resultados de dichos estudios¹¹⁸.

- **Pruebas serológicas en eluidos sanguíneos obtenidos a partir de papel filtro**

Al igual que ocurre con la IFI, el ELISA ha sido ensayado para determinar su capacidad diagnóstica en eluidos sanguíneos. En 1991 un grupo de investigadores compararon los resultados del ELISA al usar muestras de eluidos sanguíneos y muestras de suero para detección de anticuerpos anti virus dengue en 135 donantes de sangre en Cuba, el porcentaje de concordancia obtenido fue de 98,5% - 99,2% ($p < 0,005$) hasta 6 meses después de tomadas las muestras de papel filtro¹¹⁹.

En Chile la evaluación de los eluidos para el diagnóstico de infección por *T. cruzi*, se llevó a cabo en pacientes con resultado parasitológico positivo, otros con diagnóstico positivo por HAI y un grupo de individuos aparentemente sanos. La concordancia del ELISA y HAI entre muestras de eluidos y suero fue de 98,3%; la

¹¹⁵ Lemestre JL, Afchain D, Orozco O, Loyens M, Breniere FS, Desjeux P, et al. Specific and sensitive immunological diagnosis of Chagas disease by competitive antibody enzyme immunoassay using a *Trypanosoma cruzi*-specific monoclonal antibody. Am J Trop Med Hyg. 1986; 35 (1): 86-93.

¹¹⁶ Campos Y, Briceño L, Reina K, Figarella K, Pérez JL, Mosca W. Serological diagnosis of Chagas disease: evaluation and characterisation of a low cost antigen with high sensitivity and specificity. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104 (6): 914-7.

¹¹⁷ Hernández P, Heimann M, Rieira C, Solano M, Santalla J, Luquetti A, et al. Highly effective serodiagnosis for Chagas disease. Clin Vaccine Immunol. 2010; 17 (10): 1598-04.

¹¹⁸ Orozco L, Camargo D. Evaluación de tecnologías diagnósticas y tipos de muestreos. Biomédica, 1997;7: 321-4.

¹¹⁹ Vázquez S, Fernández R, Llorente C. Utilidad de sangre almacenada en papel filtro para estudios serológicos por ELISA de inhibición. Rev Inst Med trop. 1991; 33 (4): 309-11.

sensibilidad del ELISA frente HAI fue de 100%.¹²⁰. Las falencias de este estudio están dadas por el muestreo pseudoretrospectivo, el establecimiento erróneo de la especificidad del ELISA teniendo en cuenta únicamente los resultados de los controles negativos y el desconocimiento del tipo de concordancia reportada.

En zona endémica de Panamá, Anthony y colaboradores compararon eluidos sanguíneos por ELISA frente a sueros para la FC y hemaglutinación. La sensibilidad y especificidad del ELISA con eluido frente a FC y hemaglutinación directa con muestra de suero fue de 100% y 84,4% respectivamente.¹²¹. Sin embargo en este estudio, se realizó un muestreo pseudoretrospectivo para la evaluación de las pruebas diagnósticas, por lo tanto los resultados están sesgados¹²².

En zona endémica de Boyacá, Orozco y colaboradores establecieron un área bajo la curva ROC de 0,99 para los eluidos sanguíneos al comparar con IFI positivo en una dilución $\geq 1:32$. El kappa obtenido al comparar suero y eluido sanguíneo teniendo como punto de corte para el ELISA una densidad óptica $\geq 0,4$ fue de 0,96. Con estos resultados los autores recomiendan el uso de eluido sanguíneo para el diagnóstico de infección por *T. cruzi*¹²³. Este estudio es quizá, dentro de los trabajos revisados, el único que presenta de manera explícita las características de reproducibilidad obtenidas por las pruebas evaluadas y demuestra la superioridad del ELISA frente a la IFI mediante el empleo de un muestreo transversal por lo que sus hallazgos son válidos.

¹²⁰ Contreras M, Salinas P, Sandoval L, Solís F, Rojas A. Utilidad de la ELISA-IgG en muestras de sueros y eluidos de sangre en papel filtro en le inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas. Bol Chil Parasitol. 1992; 47: 76-81.

¹²¹ Anthony R, Johnson C, Sousa O. Use of micro-ELISA for quantitating antibody to *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. Am J Trop Hyg 1979; 28 (6): 969- 73.

¹²² Orozco L, Camargo D. Evaluación de tecnologías diagnósticas y tipos de muestreos. Biomédica, 1997;7: 321- 4.

¹²³ Orozco LC, Camargo D, López M, Duque S, Gualdrón L, Cáceres E, et al. Inmunodiagnóstico de la infección en humanos por *Trypanosoma cruzi* mediante ELISA utilizando sangre recolectada en papel filtro. Biomédica. 1999; 19 (12): 164 – 8.

De esta manera se ha demostrado la utilidad de los eluidos sanguíneos para el diagnóstico de infección por *T. cruzi*, por lo que han sido ampliamente utilizados en estudios seroepidemiológicos en áreas de difícil acceso¹²⁴.

2.4.1.5 Inmunoensayo en capa fina (ICF). Método descrito por Elwing y Nilsson en 1980. Se fundamenta en la fuerte hidrofiliidad de los complejos antígeno-anticuerpo que no se unen en ausencia de anticuerpos en sueros negativos¹²⁵. La técnica consiste en sensibilizar cajas de Petri con antígeno de *T. cruzi*, sobre la que se adiciona agar, al que se le realizan perforaciones para adicionar el suero. El revelado de la reacción antígeno-anticuerpo se realiza mediante la exposición de la placa de Petri a vapores de agua a 56°C. Un resultado positivo se evidencia por una condensación mayor de agua en sueros reactivos¹²⁶.

En 1982 Nilsson y Voller compararon la capacidad de detección de anticuerpos anti *T. cruzi* del ICF frente al ELISA; obtuvieron una sensibilidad de 99% y una especificidad del 100% del ICF frente al ELISA¹²⁷. Los resultados carecen de validez dado que utilizaron un muestreo pseudoretrospectivo: las muestras provienen de dos poblaciones distintas una de zona endémica y la otra de zona en donde el contacto con el parásito es casi improbable, por consiguiente los resultados están sesgados¹²⁸.

En la tabla No. 2 se resumen algunos estudios que se han dedicado a evaluar las pruebas serológicas para el diagnóstico de infección con *T. cruzi*.

¹²⁴ Palacios X, Belli A, Espino AM. Detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en Somoto, Nicaragua, mediante ELISA indirecto e IFI en muestras de sangre en papel de filtro. Rev Panam Salud Pública. 2000; 8(6): 411-17.

¹²⁵ Rossi M, Sigales L, Zapata D. Inmunoensayo de capa fina (ICF) en el serodiagnóstico de tripanosomiasis bovina causada por el *Trypanosoma vivax*. Rev Fac Cs Vets. 2008; 49 (2): 81-9.

¹²⁶ Nilsson LA, Voller A. A comparasion of thin layer immunoassay (TIA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi*. Trans R Soc of Trop Med Hyg. 1982; 76 (1): 95-7.

¹²⁷ Ibid.

¹²⁸ Orozco L, Camargo D. Evaluación de tecnologías diagnósticas y tipos de muestreos. Biomédica, 1997;7: 321-4.

Tabla 2. Resumen de las características de algunos estudios que se han evaluado la reproducibilidad de las pruebas serológicas para el diagnóstico de infección con *T. Cruzi*

LUGAR	AÑO	AUTOR	TAMAÑO MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	TIPO DE MUESTREO	PRUEBAS EVALUADAS	HALLAZGOS
México zona endémica	1978	Kagan et al	150	Suero y Eluído sanguíneo	Pseudoretrospectivo	HAI vs FC	La reproducibilidad prueba-reprueba de HAI en muestra de suero y eluído fue de 77% para la misma dilución (no hay claridad sobre el porcentaje reportado). El acuerdo entre sueros y eluídos por la técnica HAI fue de 93% cuando el punto de corte fue el título 1:64. El acuerdo observado entre HAI y FC en muestras de suero fue de 81%.
Chile	1992	Contreras et al	64	Eluído sanguíneo	Pseudoretrospectivo	ELISA HAI	Concordancia (sin especificar de que tipo) entre sueros y eluídos procesados por ELISA: 98,3% ELISA frente HAI S: 100%
Argentina, Brasil	1992	Pan et al	1392	Plasma y suero	Pseudoretrospectivo	ELISA IFI	Concordancia (sin especificar de que tipo):

LUGAR	AÑO	AUTOR	TAMAÑO MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	TIPO DE MUESTREO	PRUEBAS EVALUADAS	HALLAZGOS
						HAI	ELISA vs HAI:97,38% ELISA vs IFI:90,21% ELISA frente a IFI & HAI S:97,89% ELISA+HAI= Lab I S:96,04% E:98,91%; Lab II S:78,08% E:97,95%; Lab III S: 99,4% E: 99% ELISA+IFI= Lab I S:58,55% E:75%; Lab II S:96,74% E:100%; Lab III S:99,49 E:98,67
Venezuela zona endémica	1993	Ross & Novoa	48	Suero y Eluído sanguíneo	Transversal	ELISA IFI HAI	Evaluaron reproducibilidad de las pruebas (sin especificar de qué tipo) mediante kappa así: ELISA vs IFI: 0,86 ELISA vs HAI: 0,76 IFI vs HAI: 0,82. El acuerdo entre los laboratorio mediante kappa para ELISA: 0,88; para IFI: 0,93 y para HAI: 0,67.
Colombia zona	1999	Orozco et al	595	Eluído sanguíneo	Transversal	ELISA vs IFI	Referente: IFI Área bajo la curva ROC:0,99

LUGAR	AÑO	AUTOR	TAMAÑO MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	TIPO DE MUESTREO	PRUEBAS EVALUADAS	HALLAZGOS
endémica							kappa: 0,96 con punto de corte para ELISA $\geq 0,4$
Colombia zona endémica	2004	Gutiérrez et al	184	Suero	Incierto	ELISA local ELISA comercial ELISA recombinante IFI	Referente: ELISAS comerciales y la IFI 84% reactivos con los 3 test de referencia; Kappa $>0,80$ S: 84% E: 100%

2.4.2 Pruebas parasitológicas para el diagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi* . Este grupo de pruebas detecta de manera directa la presencia del parásito completo o sus genes. Su uso es recomendado durante la fase aguda de la enfermedad

2.4.2.1 Xenodiagnóstico. La técnica fue efectuada por primera vez en 1914 por Brumpt. Consiste en emplear ninfas de III y IV estadio del vector (en el caso de Colombia *Rhodnius prolixus*), mantenidas en el laboratorio libres de infección y en ayuno prolongado, ponerlas a alimentar sobre las extremidades del paciente y permitir que dentro de los insectos el parásito se pueda replicar^{129 130}.

El éxito de la prueba está ligado a la especie y el número de ninfas usadas durante la prueba^{131 132}.

2.4.2.2 Directo Permite apreciar los tripomastigotes en sangre periférica. El procedimiento en fresco consiste en tomar una muestra de sangre total del paciente y observar entre lámina y laminilla en búsqueda de las formas móviles y flageladas del parásito. La coloración, que bien se puede realizar con los colorantes de Wright Giemsa o Field, favorece la observación de las estructuras características del parásito como son el flagelo, el núcleo y el kinetoplasto

Estudios experimentales realizados en conejos dejan ver que al cuarto día de inoculación con una cepa de *T. cruzi* se puede apreciar un mínimo de 200

¹²⁹ Cerisola A, Rabinovich A, Álvarez M, Di Corleto C, Pruneda J. Enfermedad de Chagas y la transfusión de sangre. Bol Oficina Sanit Panam. 1972: 203-21.

¹³⁰ Morocoima A, Tineo-Brito E, Ferrer E, Herrera L, Núñez M. Enfermedad de Chagas en el estado de Anóategui, Venezuela: Registro de un caso agudo y caracterización parasitológica y molecular del aislado. Boletín de Malariología y salud ambiental. 2008; 48 (2): 121 – 6.

¹³¹ Gutierrez R, Angulo VM, Tarazona Z, Britto C, Fernandes O. Comparison of four serological tests for the diagnosis of Chagas disease in a Colombian endemic área. Parasitology. 2004; 129: 439-44.

¹³² Portela-Lindoso AA, Shikanai-Yasuda MA. Doença de Chagas crónica: do xenodiagnóstico e hemocultura a reacao em cadeia da 37 (1): 107-15.

parásitos por cada 5 milímetros cúbicos (mm³) de sangre y llegar hasta 800 parásitos al décimo día posterior a la infección in vivo. Los tripomastigotes son detectados hasta un mes después con 30 parásitos/mm³¹³³.

Al observar directos entre lámina y laminilla de sangre procedente de ratones inoculados por vía intraperitoneal con 1×10^3 tripomastigotes de la cepa "TBT" de *T. cruzi* los resultados fueron positivos en un 86% de las muestras analizadas¹³⁴.

2.4.2.3 Hemocultivo. La finalidad del hemocultivo es aislar el parásito *in vitro*. Para ésta técnica se emplean diversos medios de cultivo dentro de los que se destacan los medios Liver Infusion Tryptose (LIT) y Novy Nicolle McNeal (NNN), los que se recomienda realizar por triplicado^{135 136}.

Aunque esta prueba es ideal en la fase aguda de la infección, algunos autores han diseñado estrategias para intentar recuperar los parásitos de pacientes que se encuentran en fase crónica. Tal como lo recopila Gutierrez, entre éstas estrategias están: el aumento en volumen de sangre a cultivar, modificaciones en las concentraciones de los componentes del medio de cultivo, concentración por centrifugación, entre otros¹³⁷.

2.4.2.4 Strout. El Strout permite la concentración de los parásitos, los que al centrifugar la muestra de sangre total anticoagulada quedan suspendidos entre la capa de glóbulos blancos y el plasma, zona en la que se realiza la búsqueda de

¹³³ Ramírez LD, Brener Z. Evaluation of the rabbit as a model for Chagas disease I. Parasitological studies. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1987; 82 (4): 531-6.

¹³⁴ Basombrío M, Besuschio S, Cossio P. Side effects of immunization with live attenuated *Trypanosoma cruzi* in mice and rabbits. Infect Immun. 1982; 36 (1): 342-50.

¹³⁵ Zaidenberg A, Tournier H, Schinella G, Buschiazzi H. *Trypanosoma cruzi*: Obtención de amastigotes extracelulares y estudio de su crecimiento en diferentes condiciones de cultivo. Rev Latinoam Microbiol. 2000; 42: 21-6.

¹³⁶ Chiari E, Brener Z. Contribuição ao diagnóstico parasitológico da doença de Chagas na sua fase crônica. Rev Inst Med Trop São Paulo 1966; 8: 134-8.

¹³⁷ Gutierrez R, Angulo VM, Tarazona Z, Britto C, Fernandes O. Comparison of four serological tests for the diagnosis of Chagas disease in a Colombian endemic area. Parasitology. 2004; 129: 439-44.

las formas flageladas del parásito. La técnica ha sido modificada mediante el empleo de tubos de microhematocrito heparinizados en los que se logra el mismo efecto de concentración y requieren un volumen de sangre no mayor a 1 ml¹³⁸.

2.4.2.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La reacción en cadena de la polimerasa consiste en amplificar un fragmento de DNA, que funciona como “molde”, al que se van uniendo los oligonucleótidos tras la hibridación con los iniciadores y en presencia de la enzima TAQ polimerasa que se encarga de ir adicionando los nucleótidos a la cadena de DNA^{139 140}.

En 1989 Moser y colaboradores, realizaron los primeros ensayos para amplificar el material genético de *T. cruzi* proveniente de vectores y de mamíferos hospederos, mediante el uso los mini círculos de DNA contenido en el kinetoplasto¹⁴¹. La sensibilidad y especificidad está dada por el volumen de la muestra, las condiciones de almacenamiento de la misma, la región de DNA que se quiera amplificar, los primers seleccionados para la amplificación, las temperaturas estandarizadas para la prueba, y la cantidad de parásitos presentes en la muestra¹⁴².

La evolución de las pruebas diagnósticas desde el descubrimiento de la enfermedad de Chagas en 1909 hasta nuestros días se resume en la tabla 3¹⁴³.

¹³⁸ La Fuente C, Urjel R, Darras C, Saucedo E. Uso de tubos de microhematocrito para el diagnóstico rápido de la enfermedad de Chagas y malaria. *Ann Soc belge Méd Trop.* 1985; 1: 95-9.

¹³⁹ Villegas VE, Sánchez MC, Chuaire L. Reacción en cadena de la polimerasa y diagnóstico molecular. *Colombia Médica.* 2009; 40 (3): 347-52.

¹⁴⁰ *Ibid.*

¹⁴¹ Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1989; 27:1477-82.

¹⁴² Schijman A, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Jaramillo AM, et al. International Study to Evaluate PCR Methods for Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. *Plos Negl Trop Dis.* 2011; 5(1): 1-13.

¹⁴³ Gomes Y, Lorena V, Luquetti A. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be with regard to diagnosis and follow up studies? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104 (1): 115-21.

Tabla 3. Métodos diagnósticos para la infección por *T. cruzi* desde el descubrimiento de la enfermedad hasta hoy

PERIODO	PRUEBA	AUTORES	AÑO
1. 1909 – 1960	Xenodiagnóstico	Brump	1914
	Fijación de Complemento (FC)	Guerreiro & Machado	1913
	Aglutinación en lámina	Senejike	1943
2. 1960 – 1975	Strout	Strout	1962
	Hemaglutinación Indirecta (HAI)	Cerisola	1962
	Hemocultivo	Chiari & Brenner	1966
	Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)	Camargo	1966
	Inmunoensayo Enzimático (ELISA)	Voller	1975
3. 1975 hasta hoy	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	Mosser et al	1989
		Sturn et al	1989
		Britto et al	1995
	ELISA con antígeno purificado GP90 Kda GP72 Kda GP25 Kda GP55 Kda	Moncayo & Luquetti	1990
		Levin et al	1991
		Umezawa	1999
	Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (RT-PCR)	Cummings & Tarleton	2003
		Virreira et al	2006
		Piron et al	2007
		Duffy et al	2009

2.5 EPIDEMIOLOGÍA

La enfermedad de Chagas está concentrada en los países latinoamericanos donde la transmisión vectorial es la principal ruta de propagación del parásito. No obstante, dadas las transiciones demográficas y los movimientos migratorios se han reportado casos en países desarrollados donde antes la infección no existía.

Estos casos han sido asociados a transplante de órganos, transfusiones sanguíneas y transmisión vertical^{144 145}.

Para el año 2008, 13 países de América Latina aún persistían con transmisión de enfermedad, y se estimaba que entre 8 a 9 millones de personas de todos los grupos étnicos tenían infección por *T. cruzi*, y 25 a 90 millones se encontraban en riesgo de adquirirla. El porcentaje de infectados representó el 1,6% de la población general y de éstos un 4,1% eran pobres. Se estima que aproximadamente ocurren 50.000 casos nuevos de infección anualmente¹⁴⁶.

En América Latina la carga de la enfermedad de Chagas equivale entre cinco a diez veces la carga ocasionada por Malaria. El 99,8% de carga mundial de la enfermedad de Chagas es aportada por los países latinoamericanos, donde la prevalencia es de 10,14% y se estima que ocurren 14 muertes anuales atribuidas a este evento. 5,4 millones de individuos infectados pueden desarrollar enfermedad crónica y 900.000 manifestar megacolon o megaesófago¹⁴⁷.

En Colombia la prevalencia de infección por *T. cruzi* varía según la región de estudio. Así en Coyaima, Tolima, zona rural donde hay presencia de vectores para Chagas la infección establecida mediante prueba de ELISA con antígeno soluble fue de 8,7% en 1996¹⁴⁸.

No obstante los tamizajes realizados por los bancos de sangre permiten establecer que las prevalencias más altas de infección establecidas mediante

¹⁴⁴ Flores MD, Merino F, García S, Martín P, Merino P, et al. Surveillance of Chagas disease in pregnant women in Madrid, Spain, from 2008 to 2010. Euro Surveill. 2011; 16(38): 1-7.

¹⁴⁵ Schmunis AG. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102 Suppl 1: 75-85.

¹⁴⁶ Hotez PJ, Bottazzi ME, Franco-Paredes C, Ault SK, Periago MR. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. PLoS Negl Trop Dis. 2008; 2(9): e300.

¹⁴⁷ Mathers CD, Ezzati M, Lopez AD. Measuring the burden of neglected tropical diseases: the global burden of disease framework. PLoS Negl Trop Dis. 2007; 1(2):e114.

¹⁴⁸ Corredor A, Álvarez CA, Agudelo CA, Bueno M, López MC, Cáceres E. et al. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania chagasi* infection and risk factors in a Colombian indigenous population. Rev Inst Med Trop. 1999; 41(4): 229-34.

prueba de ELISA las presentan los departamentos de los llanos y el oriente colombiano¹⁴⁹. Así para el 2003 los datos presentados por el grupo de Bancos de Sangre Nacional fueron: Casanare 7,2%, Arauca 2,7%, Guaviare 2,56%, Norte de Santander 2,27%. Meta 1,27% y Santander 1,25%¹⁵⁰.

En Santander, en algunos municipios, donde las condiciones de la vivienda favorecen la domiciliación del vector, la prevalencia es alta. En un estudio realizado en tres municipios considerados zona endémica para la Infección (Mogotes, San Joaquín y Gámbita) se encontró una reactividad del 52,5% con una prueba de ELISA que empleó una cepa local de *T. cruzi*¹⁵¹.

En gestantes ha sido ampliamente documentada la infección por *T. cruzi* en países donde no existe la transmisión vectorial por no presentar circulación del vector pero si tienen un importante número de inmigrantes latinos, por ejemplo en España donde sólo las transfusiones sanguíneas y la transmisión vertical son las únicas rutas de infección¹⁵².

En Latinoamérica la mayoría de los estudios se han realizado en los países del Cono Sur, siendo Bolivia el que arroja las tasas más altas de prevalencia de la infección en las mujeres en edad fértil¹⁵³¹⁵⁴. A continuación se presenta una tabla que resume los principales hallazgos de frecuencia de infección por *T. cruzi* en gestantes:

¹⁴⁹ Behrend M, Beltrán M, Restrepo M, Kroeger A. Control de la enfermedad de Chagas en bancos de sangre de Colombia. *Biomédica*. 2002; 22: 39-45.

¹⁵⁰ Beltrán M, Bermúdez I, Forero IC, Ayala M, Rodríguez MJ. Control de la infección por *Trypanosoma cruzi* en donantes de sangre de Colombia, 2003. *Biomédica*. 2005; 25: 527- 32.

¹⁵¹ Gutierrez R, Angulo VM, Tarazona Z, Britto C, Frenandez O. Comparison of four serological tests for the diagnosis of Chagas disease in Colombian endemic area. *Parasitology*. 2004; 129: 439-44.

¹⁵² Flores MD, Merino F, García S, Martín P, Merino P, et al. Surveillance of Chagas disease in pregnant women in Madrid, Spain, from 2008 to 2010. *Euro Surveill*. 2011; 16(38): 1-7.

¹⁵³ Romero M, Postigo J, Schneider D, Chippaux JP, Santalla JA, Brutus L. Door-to-door screening as a strategy for the detection of congenital Chagas disease in rural Bolivia. *L. Trop Med Int Health*. 2011; 16(5): 562-9.

¹⁵⁴ Brutus L, Scheider D, Postigo J, Romero M, Santalla J, et al. Congenital Chagas disease: diagnostic and clinical aspects in an área without vectorial transmission, Bermejo, Bolivia. *Acta Trop*. 2008;106 (3): 195-9.

Tabla 4. Prevalencia de infección por *T. cruzi* en gestantes.

Autor	País / Región	Diseño del estudio	N	Prueba	Criterio de positividad	Prevalencia %
Romero et al. 2011	Bolivia (Carapari)	Transversal marzo 2004 a noviembre 2005	526	Prueba rápida (Stat-Pak®) HAI (Polychaco®) ELISA (Wiener®)	Tamizaje con prueba rápida. Confirmación con HAI y ELISA. Positividad con ambas pruebas	64,6 (339/526)
Apt et al. 2010	Chile (Provincia de Choapa)	Transversal 2005 a 2008	3778	ELISA IFI	Tamizaje con ELISA. Confirmación con IFI \geq 20	3,3 (123/3778)
De Rissio AM et al. 2010	Argentina (Buenos aires, Bolivia)	Transversal 1997-2004	6204	IFI ELISA HAI antígeno local	Dos de las tres pruebas HAI e IFI \geq 1/32; ELISA DO \geq 0,2	49,5 (3069/6204)
Araujo AB et al. 2009	Brasil (Rio Grande do Sul)	Transversal II semestre 2004	351	ELISA (Wiener®) IFI	Tamizaje con ELISA (Wiener®). Confirmación con ELISA e IFI Biolab- Mérieux® y HAI Wiener®. Positividad a las 3 pruebas	0,3 (1/351)

Autor	País / Región	Diseño del estudio	N	Prueba	Criterio de positividad	Prevalencia %
Bern C et al. 2009	Bolivia (Santa cruz)	Transversal noviembre 2006 a junio 2007	530	Tamizaje con HAI (InBios®) y Directo. IF, ELISA bioMérieux® y Wiener®)	Tamizaje HAI≥1/16. Confirmación con 2 o más pruebas reactivas.	29 (154/530)
Jackson Y et al. 2009	Suiza (inmigrantes latinas)	Transversal 2008 a 2005	72	IFI antígeno local	No dice	9,7 (7/72)
Russomando G. 2009	Paraguay (Coordillera y Paraguari)	Transversal 1999 a 2004	7260	ELISA convencional y ELISA SAPA	Reactividad a las dos pruebas realizadas.	6,6 (417/7260)
Brutus et al. 2008	Bolivia (Provincia de Arce localidad de Bermejo)	Transversal diciembre 2002 a enero 2004	115	Prueba rápida (InBios®) HAI (Polychaco®) ELISA (Wiener®)	Tamizaje con prueba rápida. Confirmación con HAI y ELISA. Positividad con ambas pruebas	33,9 (172/508)

Autor	País / Región	Diseño del estudio	N	Prueba	Criterio de positividad	Prevalencia %
Paricio-Talayero JM et al. 2008	España (Valencia. Inmigrantes latinas)	Transversal marzo 2005 a junio 2007	624	Inmunoprecipitación, IFI (innogenetics®) y PCR	Tamizaje con Inmunoprecipitación. Confirmación con IFI	4,7 (29/624)
Sosa- Estani S et al. 2008	Argentina (Tucumán)	Transversal 2006-2007	518	ELISA	Reactividad al ELISA. Única prueba realizada y usada como gold estándar para comparar la prueba rápida Stat -Pak™	6,6 (34/518)
	Bolivia (Santa cruz)		488			28,8 (141/488)
	Honduras (Intibucá)		500			4,4 (22/500)
	México (Celaya y Mérida)		988			0,8 (8/988)
Rassi A et al. 2004	Brasil (Goiás, Mina Gerais, Bahía, Tocantins, Sao Paulo, Piauí)	Transversal 2008 a 2005	145	FC, ELISA, IFI, HAI	Se usaron 3 de las pruebas serológicas. Se considero resultado positivo a la reactividad ante dos de las 3 pruebas realizadas.	1,4 (2/145)

Autor	País / Región	Diseño del estudio	N	Prueba	Criterio de positividad	Prevalencia %
Blanco S et al. 2000	Argentina (Provincia de Tucumán)	Transversal 1992 a 1994	11888	HAI® (Wiener) ELISA®	Reactividad a las dos pruebas realizadas.	6,8 (803/11888)
Contreras S et al. 1999	Argentina (ciudad de General Güemes. Provincia de Salta)	Transversal agosto a diciembre 1996	276	IFI ELISA HAI	Dos de las tres pruebas reactivas	12,3 (34/276)
Zaidenberg & Segovia 1993	Argentina (Ciudad de Salta)	Transversal 1984	937	FC, IFI, HAI	Positividad a dos o más reacciones serológicas	15,9 (149/937)

En Colombia se observó que la prevalencia de infección en gestantes en un municipio del departamento de Boyacá fue de 3,34% en el año 2008 ¹⁵⁵, y en Santander un estudio realizado en una institución de salud de tercer nivel que atiende partos de gestantes procedentes de todo el territorio del departamento mostró una prevalencia de 6,9% para el año 1996 ¹⁵⁶.

No obstante estos datos de prevalencia de infección por Chagas para gestantes reportados en la literatura no son concluyentes ya que no se conoce el tipo de muestreo empleado para la selección e incorporación de las participantes en los respectivos estudios.

2.6 SEGOS

Todos los estudios epidemiológicos son susceptibles de presentar sesgos en sus resultados. Se habla de sesgo cuando aparece un error de carácter sistemático que puede modificar el resultado de la investigación ya sea por que subestima o sobreestima el hallazgo encontrado ¹⁵⁷ ¹⁵⁸. En un estudio de evaluación de tecnologías diagnósticas, estos errores pueden ser incorporados al estudio ya sea por el método utilizado para ingresar los sujetos al estudio, sesgo de selección ó por la forma en que se obtiene la información y se clasifica a cada individuo, el llamado sesgo de clasificación.

¹⁵⁵ Pavía P, Montilla M, Flórez C, Herrera G, Ospina JM, Manrique F, et al. Reporte del primer caso de enfermedad de Chagas transplacentaria analizado por AP-PCR en Moniquirá, Boyacá. *Biomédica*. 2009; 29: 513-22.

¹⁵⁶ Castañeda G. Estudio de la prevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en parturientas en el Hospital Universitario Ramón González Valencia determinación de la incidencia de Chagas congénito en hijos de madres. Trabajo de Tesis para optar al título de ginecóloga. Universidad Industrial de Santander. 1995.

¹⁵⁷ Szklo M, Nieto J. Falta de Validez: Sesgo. In: Szklo M, Nieto J, editors. *Epidemiología Intermedia. Conceptos y Aplicaciones*. Madrid: Díaz de Santos; 2003. P. 109 - 53.

¹⁵⁸ Gordis L. Más sobre las inferencias causales: sesgos, factores de confusión. En: *Epidemiología* tercera edición. Universidad de San Pablo CEU. Madrid. Elseiver. 2005. P 224 – 38.

2.6.1 Sesgos de selección. Este tipo de sesgo tiene que ver con el muestreo y con los criterios de elegibilidad de los participantes del estudio, entre otros. Por ejemplo, el sesgo de seguridad del paciente que ocurre cuando el procedimiento diagnóstico es invasivo o riesgoso y puede poner en peligro la integridad del paciente, por lo que el grupo de estudio es limitado¹⁵⁹.

Existe además el término “spectrum bias” que hace referencia básicamente a dos cosas: el rendimiento de la prueba cambia cuando se aplica a subgrupos de pacientes que son diferentes; este cambio en el rendimiento de la prueba genera un sesgo porque se escoge personas con un mismo espectro de la enfermedad, es decir, todos están en la misma fase lo que no permite establecer si la prueba puede determinar el diagnóstico así estén en fase aguda, crónica¹⁶⁰.

Otro tipo de sesgo es el sesgo de verificación (*verification bias*) que se presenta cuando no todas las personas de la muestra reciben la confirmación definitiva del diagnóstico con el mismo estándar de oro debido a un aumento en los costos o al retiro del individuo del estudio¹⁶¹.

2.6.2 Sesgos de clasificación. Este sesgo es muy frecuente en estudios de validación de pruebas diagnósticas y su ocurrencia tiene graves consecuencias en la S y E cuando la misma prueba de referencia no se aplica a todos los participantes del estudio. Otra forma de incurrir en este tipo de sesgo se presenta cuando se es usa como gold estándar la prueba que se está evaluando¹⁶².

¹⁵⁹ Kelly S, Berry E, Proderick P, Harris KM, Cullingworth J, Gathercole L, et al. The identification of bias in studies of the diagnostic performance of imaging modalities. *The British Journal of Radiology*. 1997; 70: 1028-35.

¹⁶⁰ Willis B. Spectrum bias- why clinicians need to be cautious when applying diagnostic test studies. *Family Practice*. 2008; 25: 390-96.

¹⁶¹ *Ibíd.*

¹⁶² Kelly S, Berry E, Proderick P, Harris KM, Cullingworth J, Gathercole L, et al. The identification of bias in studies of the diagnostic performance of imaging modalities. *The British Journal of Radiology*. 1997; 70: 1028-35.

Cuando se realiza un análisis por subgrupos, por ejemplo de edad, es probable que la S y E sea diferente en cada uno de éstos y se llegue a clasificar erróneamente a los sujetos¹⁶³.

¹⁶³ Mulherin S, Miller W. Spectrum bias or spectrum effect? Subgroup variation in diagnostic test evaluation. *Ann Intern Med.* 2002; 137: 598-602.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDIO

Estudio de evaluación de tecnologías diagnósticas en fase II¹⁶⁴.

3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

3.2.1 Población blanco **Gestantes de zona endémica de Santander.**

3.2.2 Población de estudio Gestantes de zona endémica de Santander participantes del proyecto “Desarrollo e implementación de un programa piloto de vigilancia de Chagas congénito en Colombia”, a quienes se les realizó determinación de anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi* durante su periodo gestacional, que vivían en zonas endémicas de Santander y asistieron a control prenatal a los hospitales de 23 municipios de Santander (Capitanejo, Charalá, Concepción, Coromoro, Curiti, Enciso, Gámbita, Guacamayo, Hato, Macaravita, Málaga, Mogotes, Molagavita, Oiba, Onzaga, Palmas del Socorro, San Joaquín, San José de Miranda, San Miguel, San gil, Simacota, Socorro y Suaita) durante el periodo comprendido entre agosto de 2010 y septiembre de 2011.

3.3 DISEÑO DE MUESTREO

Corte transversal de las gestantes de zona endémica de Santander para Chagas a quienes se les tomó muestra de suero y de sangre total en papel filtro para establecer la presencia de anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi* mediante las pruebas de ELISA, IFI y HAI. Posteriormente se realizó un muestreo aleatorio

¹⁶⁴ Orozco LC 2010. Fases y Muestreos, o de cómo tomar las personas de una población para hacer el estudio. En: Medición en Salud Diagnóstico y Evaluación de Resultados Un manual crítico más allá de lo básico. Bucaramanga: División de publicaciones UIS; 2010. p 63-72.

simple para seleccionar una submuestra de los sueros a la que se les realizó de nuevo las pruebas serológicas.

3.4 CÁLCULO DEL TAMAÑO DE MUESTRA

Con el software Stata 10 se realizó el cálculo del tamaño de muestra al tener en cuenta un CCI de 0,80 para ELISA y 0,76 para IFI, variando el poder entre 0,8 y 0,9 y con una proporción de diagnosticados positivos de 0,03 y un nivel de confianza de 95% se estimó que entre 600 y 800 pruebas eran necesarias¹⁶⁵. Fenómeno similar se obtuvo cuando el cálculo se hizo a partir de kappas de 0,95 para ELISA positivo versus 0,90 para IFI positivo.

El rango de tamaño de muestra que se presenta corresponde al calculado según datos de un estudio similar donde se obtuvo una prevalencia de 3% (Orozco et al 1999) y se asume un poder que varía desde 0,8 a 0,9.

El estudio se realizó con 777 sueros y eluidos sanguíneos para alcanzar un poder de 0,9.

3.5 CRITERIOS DE SELECCIÓN

3.5.1 Criterios de inclusión

- Residir en un municipio de Santander seleccionado para el estudio “Desarrollo e implementación de un programa piloto de vigilancia de Chagas congénito en Colombia”.
- Asistir al control prenatal del hospital municipal.

¹⁶⁵ Orozco LC, Camargo D, López M, Duque S, Gualdrón L, Cáceres E, et al. Inmunodiagnóstico de la infección en humanos por *Trypanosoma cruzi* mediante ELISA utilizando sangre recolectada en papel filtro. Biomédica. 1999; 19 (12): 164-8.

- Diligenciamiento completo del cuestionario, por parte del personal de enfermería o laboratorio clínico que contiene la información básica de cada gestante.
- Obtención de muestra de suero y sangre completa en papel filtro.

3.6 VARIABLES DEL ESTUDIO

Se estudiaron las variables relacionadas con las pruebas serológicas y las sociodemográficas de las gestantes. La descripción de la operacionalización de las variables se encuentra en el Anexo A.

3.6.1 Variables sociodemográficas Se tuvieron en cuenta la edad, el municipio de residencia, lugar de residencia, escolaridad, estado civil, estrato socioeconómico y la ocupación.

3.6.2 Variables relacionadas con las pruebas serológicas. Respecto a las pruebas serológicas se evaluaron para ELISA las absorbancias obtenidas en suero y en eluído sanguíneo; para IFI y HAI los títulos obtenidos en las dos lecturas realizadas con cada una de estas pruebas.

3.7 CONTROL DE POSIBLES SEGOS

3.7.1 Sesgo de selección: para el control de este sesgo se aplicó una estrategia que garantizó la aleatoriedad donde todos los individuos tuvieron la misma probabilidad de ser elegidos.

3.7.2 Sesgo de clasificación: En cuanto a los sesgos de clasificación, se puede presentar el “*diagnostic-review*” si la interpretación de la prueba está condicionada al conocimiento del resultado obtenido tras la realización de la prueba de referencia. Para contrarrestar este sesgo, cada una de las pruebas se realizó de manera independiente, sin tener conocimiento del resultado obtenido por las otras pruebas efectuadas.

3.8 RECOLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras de sangre total y suero fueron tomadas por la bacterióloga o la auxiliar en el laboratorio de cada municipio participante en el estudio. Las muestras (sueros y filtros) se identificaron con el nombre y el apellido de la gestante, fecha de toma y un código mediante el que se relacionaron los cuestionarios y el consentimiento informado.

La codificación fue antecedida por la letra S que identificó a las muestras procedentes del departamento de Santander, seguida de la letra correspondiente a cada municipio que van de la A a la Z y asignado de manera consecutiva según el municipio. Las letras correspondientes a cada municipio fue única y dependía de la provincia a la que corresponda así: de la A a la H los municipios de la Provincia Guanentina; de la I a la Q los de la Provincia Comunera y de la R a la Y los de la Provincia García Rovira.

La numeración de cada municipio obedeció al número consecutivo que era asignado a medida que ingresaba una nueva gestante al estudio.

Las muestras, junto con los cuestionarios y los consentimientos informados, fueron enviadas al Laboratorio Departamental de Salud Pública de Santander. Los formatos de cuestionario y consentimiento informado se encuentran en los anexos B y C.

El envío de los sueros desde los municipios hacia Bucaramanga se realizó en nevera portátil de icopor con barras de hielo para mantener las condiciones de refrigeración. Las muestras tomadas en papel filtro fueron enviadas en sobre de manila dentro de una bolsa resellable con silica gel para evitar la humedad y consiguiente contaminación con hongos.

La información de los cuestionarios se digitó en una hoja de Excel Microsoft 2010. Previo envío de las muestras al Instituto Nacional de Salud, se comparó la información del nombre y código de los cuestionarios y de las muestras de tal forma que coincidieran y se comprobara que no hubo errores de codificación en el marcado de los sueros y filtros. De igual forma se verificó que no existieran repeticiones en la numeración consecutiva de las gestantes.

El envío de las muestras y cuestionarios al Instituto Nacional de Salud, se realizó de manera periódica cada quince días con un embalaje de los sueros y filtros igual al descrito anteriormente. Allí dos personas digitaron de manera independiente, la información contenida en los cuestionarios, para luego ser validada mediante el software Epi-info y obtener así la base completamente depurada.

El procesamiento de las muestras se llevó a cabo por bacteriólogas entrenadas de la sección de Chagas del Instituto Nacional de Salud, quienes emplearon una muestra de eluído para la técnica de ELISA y una muestra de suero para la técnica de IFI HAI y ELISA. El antígeno empleado para las técnicas de ELISA e IFI fue la cepa NV previamente caracterizada como linaje TcI. Para la HAI se utilizó el kit de la casa comercial Wiener® (anexo B).

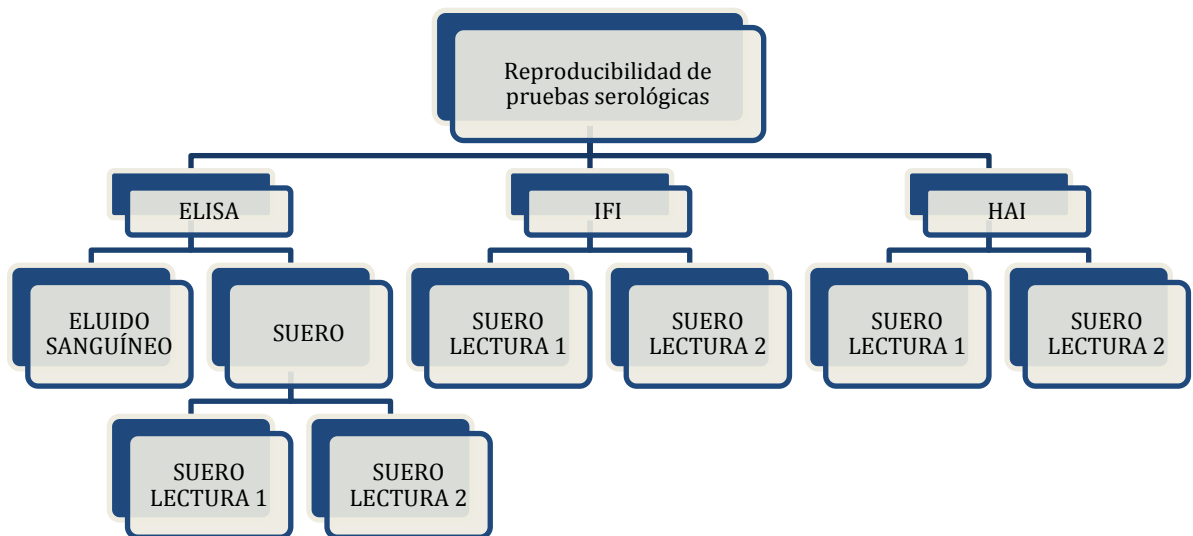
Los protocolos para la ejecución de las pruebas correspondieron a los estandarizados en el Instituto Nacional de Salud. El montaje de las muestras para el ELISA se realizó por duplicado y la lectura de la misma fue la absorbancia emitida por el lector de placas de la institución. La IFI se montó en diluciones de

1:8 hasta 1:256 para cada muestra y el reporte del resultado fue la última dilución en la que se observó fluorescencia con objetivo de 40x en el microscopio de Inmunofluorescencia. El montaje e interpretación de la HAI fue el sugerido por el fabricante.

Las muestras seleccionadas para el estudio, mediante muestreo aleatorio simple, fueron de nuevo procesadas para las tres técnicas antes descritas, en el caso del ELISA, la segunda vez se utilizó muestra de suero y se montó por duplicado.

A continuación se relaciona el tipo de muestra empleado para cada una de las pruebas a evaluar.

Diagrama No1. Tipo de muestra empleado para cada una de las pruebas serológicas.



3.9. ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

3.9.1 Concordancia: para observar las diferencias obtenidas entre las lecturas de las pruebas de ELISA uno y dos en muestra de suero y en eluido sanguíneo, se utilizaron los límites de acuerdo de Bland y Altman¹⁶⁶.

3.9.2. Reproducibilidad de variables continuas: para realizar la comparación de datos continuos, en este caso las absorbancias del ELISA, se empleó el Coeficiente de Correlación Intraclase (ICC) 2,1 y 3,1 con un intervalo de confianza de 95%¹⁶⁷.

3.9.3. Reproducibilidad de variables dicotómicas: para realizar el análisis de reproducibilidad al interior de cada prueba serológica fue empleado el índice kappa¹⁶⁸, medido en diferentes puntos de corte establecidos para cada prueba así: para la prueba de ELISA con absorbancias que van desde 0,3 hasta 0,5; para IFI con dilución desde 1/32 hasta 1/256. Para HAI dilución de 1/4 a 1/16.

3.9.4. Comparación de la reproducibilidad de variables dicotómicas dependientes: para efectuar la comparación entre las tres pruebas serológicas ELISA, IFI y HAI, fue preciso calcular el kappa para muestras dependientes, es decir pareadas, ya que las muestras empleadas para realizar las pruebas eran las mismas. Por lo tanto, fue necesario calcular la varianza y la covarianza de las pruebas. La fórmula utilizada para la determinación de la covarianza entre las kappas fue la propuesta por Donner et al¹⁶⁹.

¹⁶⁶ Orozco LC 2010. Confiabilidad o de la consistencia, reproducibilidad, acuerdo y algo más: En. Medición en Salud Diagnóstico y Evaluación de Resultados Un manual crítico más allá de lo básico. Bucaramanga: División de publicaciones UIS; 2010. p 73-103.

¹⁶⁷ *Ibíd.*

¹⁶⁸ Seigel D, Podgor M, Remaley A. Acceptable values of kappa for comparison of two groups. *Am J Epidemiol.* 1992; 135 (5): 571-78.

¹⁶⁹ Donner A, Shoukri M, Klar N, Bartfay E. Testing the equality of two dependent kappa statistics. *Statist Med.* 2000; 19: 373-87.

Tabla 5. Datos individuales de las pruebas para el cálculo de la covarianza

Prueba 2	Prueba 1			TOTAL
	(0,0)	(discord)	(1,1)	
(0,0)	V_{11} θ_{11}	V_{12} θ_{12}	V_{13} θ_{13}	n_{12} $P_1(K_2)$
(discord)	n_{21} θ_{21}	n_{22} θ_{22}	n_{23} θ_{23}	n_{22} $P_2(K_2)$
(1,1)	n_{31} θ_{31}	n_{32} θ_{32}	n_{33} θ_{33}	n_{22} $P_3(K_2)$
TOTAL	$P_1(K_1)$ n_{11}	$P_2(K_1)$ n_{21}	$P_3(K_1)$ n_{31}	N

Donde:

V= evaluación conjunta de las frecuencias

θ = probabilidad subyacente.

La determinación de la varianza se realizó con la fórmula que sigue:

$$Var(k_j) = \frac{1 - k_j}{N_j} \left[(1 - k_j)(1 - 2k_j) + \frac{k_j(2 - k_j)}{2\pi_j(1 - \pi_j)} \right], j = 1, 2$$

Para la obtención del dato de la covarianza se empleó la fórmula siguiente:

$$Ncov(K1, K2) = d_1A - d_2(A/2 + B) - d_3(A/2 + B) + d_4(A + 2B + 2C + 4D)$$

Donde :

$$d_1 = [4\pi^2(1 - \pi)^2]^{-1}$$

$$d_2 = \frac{P2(K1) (1 - 2\pi)}{4\pi^3 (1 - \pi)^3}$$

$$d_3 = \frac{P2(K2) (1 - 2\pi)}{4\pi^3 (1 - \pi)^3}$$

$$d_4 = \frac{P2(K1) P2(K2) (1 - 2\pi)^2}{16\pi^4 (1 - \pi)^4}$$

$$A = \theta_{22} - P2(K1) P2(K2)$$

$$B = \theta_{32} - P3(K2) P2(K1)$$

$$C = \theta_{23} - P3(K1) P2(K2)$$

$$D = \theta_{33} - P3(K2) P3(K1)$$

Tabla 6. Datos para determinación de covarianza para ELISA y HAI

HAI	Elisa 0.3			TOTAL
	(0,0)	(discord)	(1,1)	
(0,0)	748 T11=0,96267696	1 T12=0,001287	4 T13=0,00514801	753 P1k2=0,96911197
(discord)	0 T21=0	0 T22=0	5 T23=.00643501	5 P2k2=.00643501
(1,1)	1 T31=0,001287	0 T32=0	18 T33=0,02316602	19 P3k2=0,02445302
TOTAL	749 P1k1=0,96396396	1 P2k1=0,001287	27 P3k1=0,03474903	777

$\kappa=0,03474903$

Tabla 7. Datos para determinación de Covarianza para IFI y ELISA

IFI	Elisa 0.3			TOTAL
	(0,0)	(discord)	(1,1)	
(0,0)	747 T11=0,96138996	1 T12=0,00128700	4 T13=0,00514801	752 P1k2=0,96782497
(discord)	1 T21=0,001287	0 T22=0	0 T23=0	1 P2k2=0,001287
(1,1)	1 T31=0,001287	0 T32=0	23 T33=0,02960103	24 P3k2=0,03088803
TOTAL	749 P1k1=,96396396	1 P2k1=0,001287	27 P3k1=0,03474903	777

$\kappa=0,03474903$

Tabla 8. Datos para determinación de Covarianza para IFI y HAI

HAI	IFI			TOTAL
	(0,0)	(discord)	(1,1)	
(0,0)	751 T11=0,96653797	1 T12=0,001287	1 T13=0,001287	753 P1k2=0,96911197
(discord)	1 T21=0	0 T22=0	4 T23=0,00514800	5 P2k2=0,00643501
(1,1)	0 T31=0	0 T32=0	19 T33=0,024453024	19 P3k2=0,02445302
TOTAL	752 P1k1=0,96782497	1 P2k1=0,001287	24 P3k1=0,03088803	777

$$\kappa = 0,03088803$$

Con los datos anteriores fue posible establecer los valores de Z y por consiguiente los valores de p con los que se compararon las pruebas serológicas ELISA, IFI y HAI.

Para el cálculo de Z se empleó la fórmula propuesta por Roldán & Luna 2009¹⁷⁰.

$$Z = \frac{K1 - K2}{\sqrt{\text{var}(k1) + \text{var}(k2) - 2\text{Cov}(k1, k2)}}$$

¹⁷⁰ Roldán JA, Luna JD. Comparison of wighted kappa coefficients of multiple binary diagnostic test done on the same subjects. Statist Med. 2010, 29: 2149-65.

4. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El estudio está enmarcado dentro de los lineamientos de la resolución No. 008430 del 4 de octubre de 1993, por lo que se considera una investigación de riesgo mínimo de acuerdo al Artículo II del Capítulo I.

El proyecto fue evaluado y aprobado por el Comité Asesor de la Maestría en Epidemiología y el Comité Ad Hoc de Ética, de la Dirección de Investigación y Extensión de la Universidad Industrial de Santander bajo el código EPI 2033 del 15 de noviembre de 2012.

Las muestras fueron tomadas bajo consentimiento informado de las gestantes (Anexo A) que aceptaron participar en el proyecto “Desarrollo e implementación de un programa piloto de vigilancia de Chagas congénito en Colombia”, en el que está enmarcada la presente propuesta de trabajo de grado. El proyecto donde se anida éste trabajo fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Salud acta 002 del 11 de julio de 2008.

5. RESULTADOS

5.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO

Un total de 777 sueros y eluidos sanguíneos de gestantes del departamento de Santander fueron seleccionados mediante muestreo aleatorio simple (MAS) a partir de un banco de muestras del proyecto Chagas Congénito del Instituto Nacional de Salud, Grupo de Parasitología.

La inclusión de participantes por provincia fue equitativa con un 37,84% para la Comunera, 29,34% para García Rovira y 32,82% para Guanentá. Las mujeres que participaron en dicho proyecto y por consiguiente accedieron a la toma de la muestra tienen entre 13 y 45 años de edad, con un promedio de edad de 25 años y desviación estándar de 6,89 años.

El 53,15% de las mujeres procedían del área rural y 46,85% de la urbana.

Más de la mitad de las gestantes (55,86%) vivían en unión libre al momento de la inclusión en el estudio. El nivel de escolaridad en los extremos (ninguno o postgrado) fue de 0,26%; el grupo donde se concentraron las participantes tenía el bachillerato completo (29,47%).

La mayoría de ellas (77,86%) se dedican al hogar. El 15,19% que respondió que realizaba otra actividad, explicó que dicha actividad consistía en adelantar estudios de secundaria y por consiguiente no desarrollaba ninguna actividad que le generara ingresos económicos.

El 68,90% de las participantes pertenece al estrato socioeconómico 1, el 27,87% al estrato 2 (ver tabla 9).

Tabla 9. Caracterización de las gestantes de zona endémica de donde fue obtenida la muestra para el análisis de reproducibilidad de pruebas serológicas para el diagnóstico de infección por *Trypanosoma cruzi*.

Variable	N	%	IC 95%
Provincia			
Comunera	294	37,84	34,42 - 41,35
García Rovira	228	29,34	26,16 - 32,68
Guanentá	255	32,82	29,52 - 36,24
Procedencia			
Área rural	413	53,15	49,57 – 56,71
Área urbana	364	46,85	43,29 – 50,43
Edad	24,9*	6,89**	13 - 45***
Estado civil			
Unión libre	434	55,86	52,28 - 59,38
Casada	178	22,91	19,99 - 26,03
Soltera	158	20,33	17,56 - 23,34
Viuda	2	0,26	0,03 - 0,93
Separada	5	0,64	0,21 - 1,50
Escolaridad			
Ninguna	2	0,26	0,03 - 0,93
Primaria incompleta	107	13,77	11,42 - 16,40
Primaria completa	148	19,05	16,34 - 21,99
Secundaria incompleta	214	27,54	24,43 - 30,83

Secundaria completa	229	29,47	26,29 - 32,82
Tecnológica	30	3,86	2,62 - 5,47
Universitaria incompleta	22	2,83	1,78 - 4,26
Universitaria completa	23	2,96	1,88 - 4,41
Postgrado	2	0,26	0,03 - 0,93
Ocupación			
Hogar	605	77,86	74,77 - 80,74
Oficina	13	1,67	0,89 - 2,84
Fábrica	1	0,13	0,00 - 0,71
Comercio	30	3,86	2,62 - 5,47
Agricultura	9	1,16	0,53 - 2,19
Ganadería	1	0,13	0,00 - 0,71
Otro	118	15,19	12,73 - 17,91
Estrato socioeconómico			
1	534	68,9	65,33 - 71,97
2	216	27,87	24,67 - 31,09
3	22	2,84	1,78 - 4,26
4	2	0,26	0,03 - 0,93
6	1	0,13	0,00 - 0,71
Convive con animales			
Sí	566	73,03	69,57 - 75,94
No	207	26,97	23,56 - 29,90

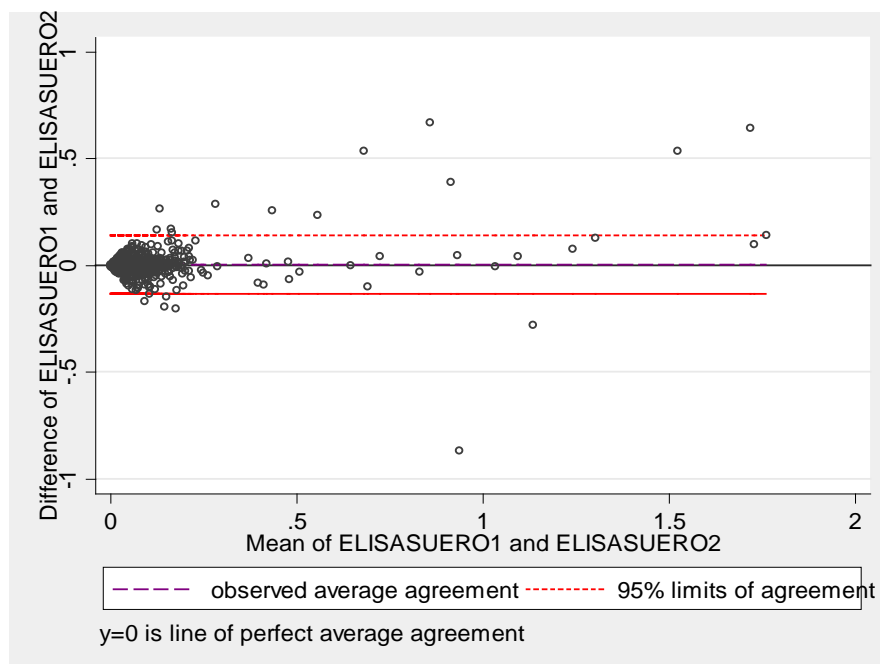
*Media **Desviación estándar ***Rango

5.2 ANÁLISIS DE CONCORDANCIA

Se realizó mediante los límites de acuerdo de Bland y Altman.

- ELISA SUERO lectura 1 vs ELISA SUERO lectura 2: los límites de acuerdo se encuentran entre $-0,134$ y $0,139$; la desviación estándar es de $0,07$. El promedio de la diferencia entre las mediciones es de $-0,003$. En esta gráfica se puede ver que los valores de absorbancia en el ELISA se encuentran concentrados por debajo de $0,3$. Cuando la absorbancia es superior a $0,5$ los valores se salen de los límites de acuerdo (Gráfica 1).

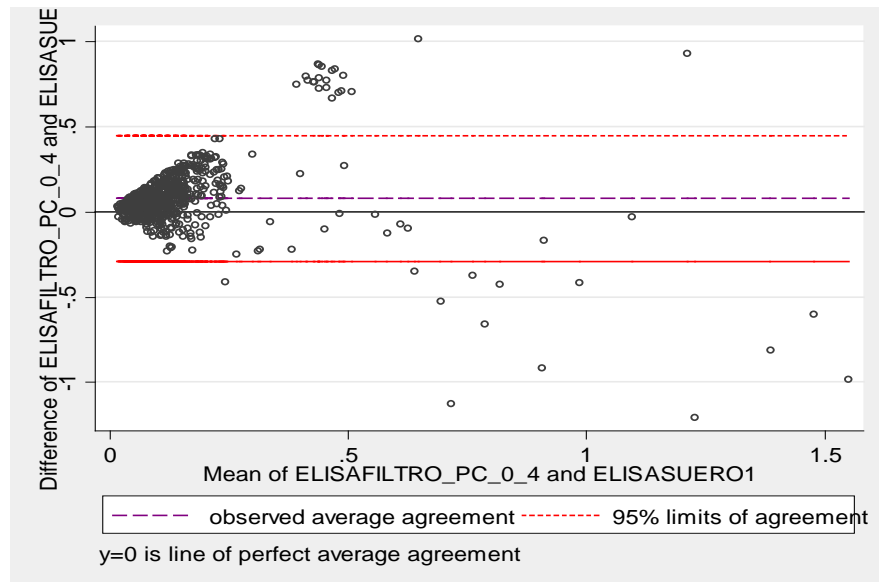
Gráfica 1. Límites de acuerdo para ELISA En suero lecturas 1 y 2



- ELISA suero lectura 1 vs ELISA eluido sanguíneo: los límites de acuerdo están entre $-0,291$ y $0,447$. La desviación estándar es de $0,188$ y el promedio de la diferencia entre las mediciones es de $0,078$. La comparación

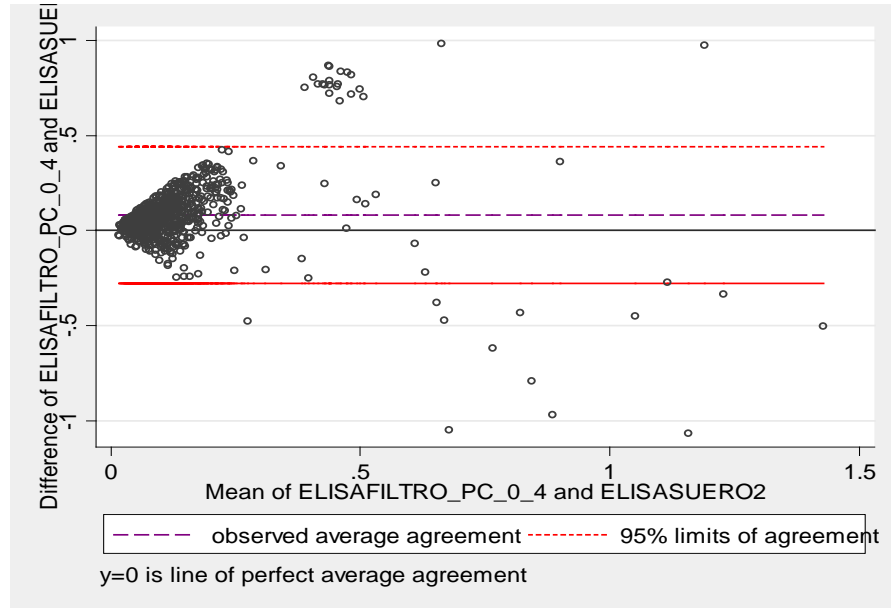
del ELISA obtenido a partir de papel filtro (eluído sanguíneo) con el ELISA SUERO lectura 1 deja ver que los valores de absorbancia se concentran por debajo de 0,3. Con absorbancias mayores a 0,4 los valores se dispersan de igual cantidad por arriba y por debajo de 0,5. No obstante, cuando la absorbancia está alrededor de 0,5 aparecen un grupo de datos por encima del límite superior (Gráfica 2).

Gráfica 2. Límites de acuerdo entre ELISA suero lectura 1 vs ELISA eluído sanguíneo



- ELISA suero lectura 2 vs ELISA eluído sanguíneo: El comportamiento del ELISA del eluído sanguíneo frente a ELISA suero lectura 2 es similar al del eluído sanguíneo frente a ELISA suero lectura 1, donde los valores de absorbancia se concentran por debajo de 0,3. El promedio de la diferencia entre las mediciones es de 0,081 (Gráfica 3).

Gráfica 3. Límites de acuerdo ELISA suero lectura 2 vs ELISA eluído sanguíneo



5.3 ANÁLISIS DE REPRODUCIBILIDAD DE VARIABLES CONTINUAS MEDIANTE COEFICIENTE DE CORRELACIÓN INTRACLASE (CCI)

Para evaluar la reproducibilidad de las pruebas serológicas con los valores de absorbancia de los ELISA y los títulos para IFI y HAI se utilizó el CCI (2,1) y (3,1). Para el caso del ELISA, se evaluó la reproducibilidad entre los sueros y entre cada lectura de suero frente al eluído sanguíneo con punto de corte en la absorbancia de 0,3 0,4 y 0,5. La mejor reproducibilidad se observó para las pruebas de ELISA en suero con un CCI de 0,924 para ambos CCI evaluados (Tabla 10).

Tabla 10. Valores de CCI para la prueba de ELISA en muestra de suero y eluido sanguíneo

Pruebas	CCI 2,1	IC95%	CCI 3,1	IC95%
ELISA suero lectura 1 vs ELISA suero lectura 2 vs ELISA eluido sanguíneo	0,575	0,489 – 0,646	0,613	0,577 – 0,845
ELISA suero lectura 1 vs ELISA suero lectura 2	0,924	0,914 – 0,934	0,924	0,914 – 0,934
ELISA suero lectura 1 vs ELISA eluido sanguíneo	0,430	0,305 – 0,531	0,469	0,412 – 0,522
ELISA suero lectura 2 vs ELISA eluido sanguíneo	0,395	0,261 – 0,503	0,438	0,379 – 0,493

5.4 ANÁLISIS DE REPRODUCIBILIDAD DE VARIABLES DICOTÓMICAS MEDIANTE KAPPA

El comportamiento de las pruebas ELISA, IFI y HAI como variables dicotómicas fue determinado mediante el cálculo de kappa con su respectivo intervalo de confianza del 95% para cada uno de los puntos de corte establecidos.

El valor de kappa más alto encontrado al evaluar la reproducibilidad en ELISA eluido sanguíneo y ELISA suero lectura 1 fue de 0,569 (IC95% 0,425 – 0,714), que fue obtenido con un punto de corte de 0,4 para la prueba en papel de filtro y de 0,5 en suero. Al establecer la reproducibilidad entre ELISA eluido sanguíneo y

ELISA suero lectura 2, el mejor valor de kappa encontrado fue de 0,564 (IC95% 0,425 – 0,703) que corresponde a un punto de corte de 0,4 en eluído y 0,3 en suero.

El mejor valor de kappa para la prueba de IFI fue para el punto de corte de la dilución 1: 32 (0,979; IC95% 0,938 – 1,000).

La comparación llevada a cabo para la prueba de ELISA suero 1 y ELISA suero 2 arrojó un kappa de 0,981 (IC95% 0,944 – 1,000) para un punto de corte de 0,3 (Tabla 11).

Tabla 11. Valores de Kappa para las tres pruebas realizadas para los diferentes puntos de corte analizados

PRUEBA	PUNTO CORTE	KAPPA	IC95%
IFI 1 vs IFI2	32	0,979	0,915 - 1,000
	64	0,951	0,862 – 1,000
	128	0,838	0,661 – 0,946
	256	0,688	0,429 – 0,864
HAI 1 vs HAI 2	4	0,880	0,743 – 0,971
	16	0,880	0,743 – 0,971
ELISA eluído sanguíneo vs ELISA suero 1	0,3	0,308	0,205 – 0,419
	0,4	0,553	0,392 – 0,675
	0,5	0,483	0,307 – 0,643
	0,3 – 0,4	0,286	0,182 – 0,400
	0,3 – 0,5	0,289	0,190 – 0,411
	0,4 – 0,3	0,556	0,400 – 0,682

	0,4 – 0,5	0,569	0,412 – 0,705
	0,5 – 0,3	0,446	0,278 – 0,604
	0,5 – 0,4	0,438	0,265 – 0,591
ELISA eluído sanguíneo vs ELISA suero 2	0,3	0,312	0,209 – 0,427
	0,4	0,553	0,406 – 0,681
	0,5	0,380	0,218 – 0,545
	0,3 – 0,4	0,303	0,209 – 0,426
	0,3 – 0,5	0,240	0,151 – 0,354
	0,4 – 0,3	0,564	0,408 – 0,696
	0,4 – 0,5	0,482	0,331 – 0,624
	0,5 – 0,3	0,455	0,289 – 0,618
	0,5 – 0,4	0,438	0,279 – 0,596
ELISA suero 1 – ELISA suero 2	0,3	0,981	0,925 – 1,000
	0,4	0,917	0,804 – 0,984
	0,5	0,868	0,728 – 0,959
	0,3 – 0,4	0,941	0,853 – 1,000
	0,3 – 0,5	0,803	0,660 – 0,912
	0,4 – 0,3	0,920	0,818 – 0,979
	0,4 – 0,5	0,860	0,732 – 0,951
	0,5 – 0,3	0,847	0,720 – 0,939
	0,5 – 0,4	0,840	0,707 – 0,934

5.5 COMPARACIÓN DE ÍNDICES KAPPA ENTRE ELISA, IFI Y HAI

Para realizar la comparación entre las tres pruebas serológicas fue empleado el índice kappa tomando como referente el mejor kappa individual obtenido por cada una de las pruebas. De esta manera se comparó el kappa obtenido para ELISA suero en punto de corte 0,3 de absorbancia, IFI dilución 1:32 y HAI dilución 1:16.

Los valores de kappa y las varianzas respectivas se resumen en la tabla 12.

Tabla 12. Valores de kappa y varianza empleados para determinar valores de Z

Prueba	Kappa	Varianza
ELISA 0,3	0,9812	0,0003601
IFI 1/32	0,9789	0,0004528
HAI 1/16	0,8805	0,0031635

A continuación se presenta un resumen de los datos obtenidos para el cálculo de la covarianza, la varianza, los valores de Z y p para cada par de pruebas serológicas objeto de comparación (Tabla 13).

Tabla 13. Datos consolidados para determinación de Z y valor de p

DATO	HAI vs ELISA	IFI vs HAI	ELISA vs IFI
d1	222,2153949	279,0047827	222,2153949
d2	7,933913744	11,254675	7,933913744
d3	39,66956872	56,273375	7,933913744
d4	0,354087682	0,56749793	0,070817536
A	$-8,28186 \times 10^{-6}$	$-8,28186 \times 10^{-6}$	$-1,65637 \times 10^{-6}$
B	$-3,14711 \times 10^{-5}$	$-3,14711 \times 10^{-5}$	$-3,97529 \times 10^{-5}$

C	0,006211396	0,00494924	-4,47221 x 10 ⁻⁵
D	0,022316304	0,023697719	0,0285277
Covarianza	-0,00027261	-0,00028419	0,00001079
Valor Z	1,57868515	1,521121091	0,08176211
p 2 colas	0,11	0,128	0,9348
p a una cola	0,057	0,0641	0,4674

5.6 DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE INFECCIÓN POR *T. cruzi*

La prevalencia de infección entendida como la positividad a todas las tres pruebas procesadas al doble (es decir 6 pruebas en total) así: ELISA en suero mayor o igual a 0,3, IFI mayor o igual a 1/32 y HAI mayor o igual a 1/16. Este cálculo mostró un total de 18 muestras seropositivas lo que representa una prevalencia de 2,32%. No obstante, si se tiene en cuenta la positividad de al menos una sola prueba, la prevalencia sube a 3,73%. Cuando se tiene en cuenta datos individualizados para cada una de las técnicas los resultados varían desde 2,45% hasta 3,60% (Tabla 14).

Tabla 14. Prevalencias encontradas para infección por *T. cruzi* con cada una de las pruebas serológicas con el punto de corte establecido

Prueba	Punto de corte	n reactivos	% Prevalencia	IC 95%
IFI SUERO 1	1/32	25	3,22	2,09 – 4,71
IFI SUERO 2	1/32	24	3,09	1,99 – 4,56
ELISA SUERO 1	0,3	28	3,60	2,41 – 5,17
ELISA SUERO 2	0,3	27	3,47	2,30 – 5,02
HAI SUERO 1	1/16	24	3,09	1,99 – 4,56
HAI SUERO 2	1/16	19	2,45	1,48 – 3,79

6. DISCUSIÓN

A través de la historia, con la aparición de nuevas tecnologías diagnósticas, son muchos los estudios que se han realizado para evaluar la calidad de las pruebas serológicas y definir la condición de infección por *T. cruzi*, dado que éstas han mostrado ser confiables y prácticas al establecer el diagnóstico de ésta infección¹⁷¹.

La mayoría de los estudios se han centrado en verificar las características de sensibilidad y especificidad de las mismas y los pocos que se han destinado a estudiar reproducibilidad han presentado falencias en el tipo de muestreo y en el tamaño de la muestra, entre otros. Dado que el manejo de la enfermedad de Chagas y la decisión de suministrar el tratamiento están sujetos al resultado de las pruebas diagnósticas, es pertinente hacer una acertada valoración de éstas¹⁷².

Para el caso de las gestantes, identificar la condición de infectada o no durante el periodo de gestación es importante debido a que ello implica un seguimiento exhaustivo tanto de la madre como del neonato por parte del personal de salud a fin de confirmar o descartar una infección en el recién nacido, de igual manera tomar decisiones en cuanto al suministro de tratamiento al bebé¹⁷³.

De otro lado, las mujeres que se identifiquen con la infección, una vez han terminado su periodo de lactancia, pueden decidir si inician el tratamiento

¹⁷¹ Zicker F, Smith PG, Luquetti AO, Oliveira OS. Mass screening for *Trypanosoma cruzi* infections using the immunofluorescence, ELISA and haemagglutination tests on serum samples and on blood eluates from filter- paper. Bull World Health Organ. 1990; 68 (4): 465-71.

¹⁷² Breinere SF, Carrasco R, Miguez H, Lemestre JL, Carlier Y. Comparisons of immunological tests for serodiagnosis of Chagas disease in Bolivian patients. Tropical and Geographical Medicine. 1985; 37: 231-238.

¹⁷³ Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Congenital transmission of Chagas disease - Virginia, 2010. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2012;61(26): 477-9.

antiparasitario con el propósito de cortar con el ciclo de infección por la vía vertical en futuros embarazos^{174 175 176}.

En el desarrollo de la discusión se aborda el desempeño de cada una de las pruebas evaluadas, y posteriormente la comparación de la reproducibilidad de las tres pruebas. Se identifican las fortalezas y limitaciones del estudio, así como las conclusiones del mismo y recomendaciones para futuras investigaciones.

6.1 HAI

La reproducibilidad de la HAI en muestra de suero determinada mediante el kappa ponderado fue de 0,88. Kraemer recomienda este coeficiente como medida de la eficiencia de la prueba entendida esta última como la probabilidad de que el test y el diagnóstico tengan un resultado concordante¹⁷⁷. Según Seigel D y cols, el valor de kappa obtenido para esta prueba presenta un nivel de reproducibilidad dentro del grado perfecto comprendido entre 0,8 a 1¹⁷⁸.

Con el CCI 2,1 y CCI 2,3 la reproducibilidad fue de 0,881 en ambos casos. Teniendo en cuenta que un valor de uno para este coeficiente es de una replicación perfecta¹⁷⁹, los resultados de reproducibilidad para esta prueba serológica, teniendo en cuenta el CCI, son perfectos.

¹⁷⁴ Bern C, Montgomery SP, Herwaldt B, et al. Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States: a systematic review. JAMA. 2007; 298: 2171-81.

¹⁷⁵ Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Congenital transmission of Chagas disease Virginia, 2010. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2012; 61(26): 477-9.

¹⁷⁶ Sosa-Estani S, Colantonio L, Segura EL. Therapy of chagas disease: implications for levels of prevention. J Trop Med. 2012; 2012: 292138.

¹⁷⁷ Kraemer H. Sensitivity and Specificity: The Signal Detection Approach. Evaluating medical test: Objective and Quantitative Guidelines. 1th ed. California: Sage Publications. 1992. p 63-94.

¹⁷⁸ Seigel D, Podgor M, Remaley A. Acceptable values of kappa for comparison of two groups. American Journal of Epidemiology. 1992; 135 (5): 571-8.

¹⁷⁹ Orozco LC 2010. Confiabilidad o de la consistencia, reproducibilidad, acuerdo y algo más. En: Medición en Salud Diagnóstico y Evaluación de Resultados Un manual crítico más allá de lo básico. Bucaramanga: División de publicaciones UIS; 2010. p 73-103.

En 1978 Kagan et al encontraron un kappa de 0,99 entre la HAI y la FC en muestras de suero¹⁸⁰. No obstante el tipo de muestreo empleado en dicho estudio fue pseudoretrospectivo, además, en este trabajo no se utilizó la fijación de complemento lo que no permite comparar los resultados obtenidos en aquel trabajo. Dado que no se ha estandarizado el empleo de eluido sanguíneo para el estuche comercial empleado, no fue posible comparar el comportamiento del HAI entre muestras de suero y eluido sanguíneo a partir de papel de filtro.

6.2 IFI

Los resultados de este estudio demostrarían las bondades del IFI como prueba de elección para el diagnóstico de infección por *T. cruzi* en un punto de corte de dilución 1/32 (kappa 0,979), tal como en la actualidad es usado. Lamentablemente, dadas las dificultades técnicas y económicas para disponer de microscopio de Inmunofluorescencia con el que la prueba pueda ser ampliamente usada, la IFI solo es empleada en laboratorios de referencia y aquellos dedicados a la investigación.

6.3 ELISA

El ELISA fue evaluado con los límites de acuerdo para observar el comportamiento entre las dos mediciones. Al evaluar los dos ELISAS que emplearon suero se observó que los datos se concentraron por debajo de valores de absorbancia de 0,3 tal como se realiza en la actualidad para establecer el diagnóstico. No obstante, al comparar los resultados del suero frente al eluido sanguíneo a partir de papel de filtro es evidente que la dispersión de los datos es mayor.

¹⁸⁰ Kagan G, Goldsmith RS, Zárata R, Allain D. Evaluación de pruebas serológicas utilizadas para estudiar la enfermedad de Chagas. PAHO Bulletin.1978; 12(4): 341-8.

Respecto a los valores de kappa determinados entre suero y papel de filtro fueron ligeros y moderados en todas las comparaciones realizadas¹⁸¹. Aún en el caso de la comparación con punto de corte 0,3 para ELISA suero y 0,4 para el papel de filtro, tal como se utiliza en la actualidad para establecer el diagnóstico de infección, los resultados no son satisfactorios. Zicker y colaboradores reportaron una mayor reproducibilidad entre muestras de suero que en eluidos sanguíneos de papel de filtro para el diagnóstico de infección por *T. cruzi*¹⁸². Lastimosamente los autores no mencionan de qué manera determinaron esa reproducibilidad para poder comparar los resultados del trabajo actual con los de ese estudio.

Contrario a los hallazgos obtenidos en este estudio, Orozco y colaboradores establecieron un kappa de 0,96 entre el ELISA en muestra de eluido sanguíneo y el IFI en muestra de suero con pacientes procedentes de zona endémica de Boyacá, Colombia¹⁸³. Algunos autores han trabajado en el desarrollo y estandarización de protocolos para el manejo de los eluidos sanguíneos a partir de papel de filtro y esto ha sido clave para el éxito de las pruebas realizadas en este tipo de muestras¹⁸⁴. La baja reproducibilidad encontrada entre los ELISA con eluidos sanguíneos a partir de papel de filtro comparada con los ELISA en suero pueden deberse a modificaciones que en algún momento se han realizado en el protocolo de manejo y procesamiento del papel de filtro que van desde el tamaño del poro, diámetro y tipo de papel empleado para la obtención de la muestra en papel filtro hasta el cálculo de la dilución final en la que ésta queda¹⁸⁵.

¹⁸¹Seigel D, Podgor M, Remaley A. Acceptable values of kappa for comparison of two groups. Am J Epidemiol. 1992; 135 (5): 571-8.

¹⁸²Zicker F, Smith PG, Luquetti AO, Oliveira OS. Mass screening for *Trypanosoma cruzi* infections using the immunofluorescence, ELISA and haemagglutination tests on serum samples and on blood eluates from filter- paper. Bull World Health Organ. 1990; 68 (4): 465-71.

¹⁸³Orozco LC, Camargo D, López M, Duque S, Gualdrón L, Cáceres E, et al. Inmunodiagnóstico de la infección en humanos por *Trypanosoma cruzi* mediante ELISA utilizando sangre recolectada en papel filtro. Biomédica. 1999; 19 (12): 164-8.

¹⁸⁴Evengard B & Linder E. Standardization of a filter- paper technique for blood sampling. Ann Trop Med and Parasitol. 1988; 82 (3): 295-303.

¹⁸⁵Ibíd.

Aunque es inminente la utilidad que se le ha dado al papel filtro para estudios de seroprevalencia¹⁸⁶, como el caso particular del estudio de la enfermedad de Chagas, autores no han reportado grandes diferencias en las cifras de la densidad óptica entre sueros y eluidos¹⁸⁷. Por lo tanto se sugiere que sea revisado uno a uno los parámetros con los que es realizado en interpretado el resultado del eluido sanguíneo para el diagnóstico de infección por *T. cruzi*.

Por otra parte, la reproducibilidad entre las dos lecturas efectuadas para la muestra de suero, teniendo en cuenta un punto de corte a una densidad óptica de 0,3 presentó un kappa de 0,981 (0,925-1,000) lo que se interpreta como un kappa perfecto¹⁸⁸. Con este punto de corte se realiza en la actualidad el diagnóstico de infección por *T. cruzi* en el INS, laboratorio de referencia para Colombia. De igual manera, con puntos de corte más altos (0,4 y 0,5) la reproducibilidad de la prueba sigue siendo perfecta.

Cuando se evaluó el comportamiento de la reproducibilidad del ELISA como variable continua, los valores obtenidos con el CCI apoyan los resultados obtenidos por el índice kappa. El CCI del eluido sanguíneo vs suero tanto 2,1 como 3,1 fue moderado. El CCI solo fue perfecto cuando se compararon las dos lecturas realizadas en ELISA sueros 1 y 2 (kappa 0,924) tanto CCI 2,1 como 3,1. Los estudios reportados en la literatura científica para la infección con *T. cruzi*, no han ahondado en evaluar la reproducibilidad medida mediante CCI, por consiguiente es limitado lo que se discute al respecto. No obstante dados estos resultados queda corroborado que la reproducibilidad de la prueba de ELISA entendida como una variable continua en muestras de suero es perfecta y por

¹⁸⁶ Vázquez S, Fernández R, Llorente C. Utilidad de sangre almacenada en papel filtro para estudios serológicos por ELISA de inhibición. Rev Inst Med trop. 1991; 33 (4): 309-11.

¹⁸⁷ Contreras M, Salinas P, Sandoval L, Solís F, Rojas A. Utilidad de la ELISA-IgG en muestras de sueros y eluidos de sangre en papel filtro en le inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas. Bol Chil Parasitol. 1992; 47: 76-81.

¹⁸⁸ Seigel D, Podgor M, Remaley A. Acceptable values of kappa for comparison of two groups. Am J Epidemiol.1992; 135 (5): 571-8.

consiguiente es recomendada para efectuar el diagnóstico de infección por *T. cruzi* en gestantes de zona endémica.

6.4 ELISA, IFI y HAI

Una única prueba serológica bien seleccionada podría ser suficiente para realizar el diagnóstico de infección por *T. cruzi*¹⁸⁹. La hipótesis inicial que se planteó en este trabajo era que la prueba de ELISA presentaba una mejor reproducibilidad frente a IFI y HAI. Los resultados de este estudio demuestran que las tres pruebas evaluadas presentan una reproducibilidad perfecta cuando se emplean muestras de suero y no existen diferencias estadísticamente significativas entre una y otra prueba ($p \geq 0,05$).

Autores expertos en bioestadística interesados en confrontar los índices kappa de muestras pareadas han desarrollado diferentes fórmulas matemáticas para hacer este tipo de comparaciones cuando las muestras tienen dependencia^{190 191 192 193}. No obstante, luego de un análisis detallado de cada una de ellas se decidió utilizar la metodología propuesta por Donner et al¹⁹⁴. La fórmula contempló el uso de la varianza, covarianza y los índices kappa de cada una de las técnicas a evaluar. Asumiendo que un valor de p menor de 0,05 es estadísticamente significativo para establecer que existen diferencias entre las pruebas, los resultados obtenidos en este estudio dejaron que ver que las pruebas ELISA, IFI, HAI no son diferentes entre ellas. Por consiguiente es recomendable el empleo de cualquiera de las

¹⁸⁹ Breinere SF, Carrasco R, Miguez H, Lemestre JL, Carlier Y. Comparisons of immunological tests for serodiagnosis of Chagas disease in Bolivian patients. *Trop Geogr Med.* 1985; 37: 231-8.

¹⁹⁰ Williamson J, Manatunga A. Modeling kappa for measuring dependent categorical agreement data. *Biostatistics.* 2000; 1 (2): 191-202.

¹⁹¹ Vanbelle S, Albert A. A bootstrap method for comparing correlated kappa coefficients. *Journal of Statistical Computation & Simulation.* 200x: 1-15.

¹⁹² Barnhart H, Williamson J. Weighted least-squares approach for comparing correlated kappa. *Biometrics.* 2002; 58: 1012-19.

¹⁹³ Roldán JA, Luna JD. Comparison of weighted kappa coefficients of multiple binary diagnostic tests done on the same subjects. *Statist Med.* 2010; 29: 2149-65.

¹⁹⁴ Donner A, Shoukri M, Klar N, Barfay E. Testing the equality of two dependent kappa statistics. *Statist Med.* 2000; 19: 373-87.

técnicas antes mencionadas para establecer el diagnóstico de infección con *T. cruzi* en gestantes de zona endémica.

Dados estos resultados es considerable ponderar que la prueba seleccionada para realizar tamizaje en gestantes que viven en zona endémica para la enfermedad de Chagas sea la que por sus virtudes de factibilidad tanto en infraestructura como en costos se ajuste a la capacidad de las instituciones encargadas de este proceso.

Si bien, la prueba de ELISA destaca dentro de sus bondades la mínima cantidad de antígeno requerido para su ejecución, es probable que tome más tiempo su montaje e interpretación que la de la IFI. Por otro lado, esta última prueba requiere además el empleo del microscopio de fluorescencia y está sujeta a la experticia de quien realiza la lectura de la prueba, por lo que su interpretación termina ligada a la subjetividad de la persona encargada de la revisión de las placas^{195 196}.

La mayoría de estudios de calidad en pruebas diagnósticas para la enfermedad de Chagas se han centrado en análisis de sensibilidad y especificidad. Los resultados reportados por Zicker et al en un trabajo realizado en zona endémica de Brasil donde se compararon las tres pruebas serológicas analizadas en esta investigación, reportan la mejor sensibilidad para el ELISA (83,2%) y una especificidad superior al 99% para las tres técnicas, ELISA, IFI y HAI¹⁹⁷. Si a estos hallazgos de validez se le agrega los encontrados en este estudio de reproducibilidad, se puede sugerir que es conveniente implementar la prueba de ELISA como test diagnóstico de infección para *T. cruzi* en gestantes de zona endémica.

¹⁹⁵ Ibid.

¹⁹⁶ Malan A, Avelar E, Litwin S, Hill H, Litwin C. Serological diagnosis of *Trypanosoma cruzi*: evaluation of three enzyme immunoassays and an indirect immunofluorescent assay. J Med Microbiol. 2006; 55: 171- 8.

¹⁹⁷ Zicker F, Smith PG, Luquetti AO, Oliveira OS. Mass screening for *Trypanosoma cruzi* infections using the immunofluorescence, ELISA and haemagglutination tests on serum samples and on blood eluates from filter- paper. Bull World Health Organ. 1990; 68 (4): 465-71.

La anterior recomendación es además soportada por los resultados obtenidos por Orozco et al, quienes en un estudio llevado a cabo en una localidad endémica de Colombia y mediante el empleo de antígeno local para evaluar el ELISA determinaron un kappa de 0,96¹⁹⁸. A su vez, López et al en la misma población de estudio establecieron para el ELISA de antígeno autóctono una sensibilidad de 98,2% y especificidad de 98,96%¹⁹⁹.

Cuando se hizo un análisis asumiendo que la muestra era considerada como positiva si daba reactividad a las seis pruebas (dos lecturas de ELISA en suero, dos lecturas para IFI y dos lecturas para HAI), la prevalencia fue de 2,32%. No obstante cuando la evaluación fue realizada teniendo en cuenta que al menos una prueba fuera positiva, el resultado de prevalencia llegó al 3,73%. Se analizó cada prueba de manera individual con lo que se encontró que la técnica más sensible fue el ELISA, la que reportó una prevalencia de 3,6%.

Los acuerdos internacionales sugieren emplear mas de una prueba serológica para establecer el diagnóstico de infección por *T. cruzi*²⁰⁰. No obstante los hallazgos del presente estudio soportan la recomendación de emplear el ELISA como prueba de elección para diagnóstico de Chagas. Así mismo lo señala Orozco et al 1999, quien encontró en el ELISA, preparado con antígeno de cepa local, las mejores cualidades diagnósticas de infección para éste evento al compararse con al prueba de IFI, considerada por algunos autores como el gold estándar²⁰¹.

¹⁹⁸ Orozco LC, Camargo D, López M, Duque S, Gualdrón L, Cáceres E, et al. Inmunodiagnóstico de la infección en humanos por *Trypanosoma cruzi* mediante ELISA utilizando sangre recolectada en papel filtro. Biomédica. 1999; 19 (12): 164-8.

¹⁹⁹ López M, Duque S, Orozco LC, Camargo D, Gualdrón L, Cáceres E, et al. Inmunodiagnóstico de la infección chagásica por ELISA. Biomédica. 1999; 19 (2): 159-63.

²⁰⁰ Organización Mundial de la Salud. 63º Asamblea Mundial de la Salud A63/17. Enfermedad de Chagas: control y eliminación. 22 de abril de 2010.

²⁰¹ Orozco LC, Camargo D, López M, Duque S, Gualdrón L, Cáceres E, et al. Inmunodiagnóstico de la infección en humanos por *Trypanosoma cruzi* mediante ELISA utilizando sangre recolectada en papel filtro. Biomédica. 1999; 19 (12): 164-8.

6.5 LIMITACIONES

Dentro de las limitaciones de este estudio se puede resaltar que no fue posible trabajar con tres pruebas que estuvieran elaboradas con el mismo antígeno; esto solo fue posible para las pruebas ELISA e IFI, que ya están estandarizadas en el INS para el uso de un antígeno preparado a partir de cepas autóctonas aisladas de pacientes infectados con *T. cruzi*. Por su parte, la prueba de HAI en la actualidad es menos usada en los laboratorios de referencia de Colombia, razón por la que no se han desarrollado protocolos para su implementación con un antígeno preparado en el laboratorio.

El eluído sanguíneo obtenido a partir de papel filtro fue leído en un solo momento para establecer un diagnóstico preliminar de infección por *T. cruzi* en las gestantes que participaron en el estudio. Por esta razón solo se contaba con una lectura para el análisis de los datos, por lo tanto, no fue posible conocer la reproducibilidad entre ELISA de muestras obtenidas en papel filtro.

No se contempló el estudio de reacción cruzada con otros hemoparásitos, por ejemplo *T. rangeli*, razón por la que algunos expertos pudieran restar peso a los resultados aquí presentados.

6.6 FORTALEZAS

Las fortalezas de este estudio fueron el tamaño de la muestra empleado para llevar a cabo el análisis, lo que permite obtener un poder suficiente para inferir los resultados obtenidos.

La selección de las gestantes de donde provenían las muestras analizadas se realizó con el apoyo de los datos actualizados de la Secretaría de Salud de Santander por lo que fueron cuidadosamente seleccionados 23 municipios

pertenecientes a tres provincias del departamento, que se ha caracterizado por ser zona endémica para infección con *T. cruzi*. A su vez se realizó un muestreo aleatorio simple para garantizar la aleatoriedad de las muestras en donde se efectuó el análisis de reproducibilidad.

Es el primer estudio que efectúa un análisis de reproducibilidad en el que se reporta el valor de kappa para cada prueba evaluada y a su vez, presenta un análisis matemático detallado de la obtención de los datos necesarios para realizar la comparación de los índices kappa entre las tres pruebas serológicas teniendo en cuenta que son muestras dependientes y, por consiguiente, se requiere de un estudio de índices kappa pareados.

7. CONCLUSIONES

Las tres pruebas serológicas evaluadas en muestra de suero presentan una reproducibilidad perfecta, determinada mediante kappa ponderado, por lo que la selección de cualquiera de ellas podría ser útil para establecer el diagnóstico de infección por *T. cruzi*.

Para la técnica de ELISA, El eluído sanguíneo obtenido de papel filtro presenta una moderada reproducibilidad cuando es comparado con la muestra de suero.

La prueba de ELISA por sus características operativas: no requiere un equipo sofisticado, permite el procesamiento de varias muestras simultáneamente y empleo de una cantidad mínima tanto de antígeno como de muestra y por los bajos costos, puede ser implementada como prueba de elección para el diagnóstico de infección con *T. cruzi*.

8. RECOMENDACIONES

Revisar el protocolo de toma de muestra, manejo y procesamiento de muestras de eluido sanguíneo a partir de papel de filtro para establecer si existen modificaciones en el mismo que hicieron que los resultados no fueran los esperados.

Emplear la prueba de ELISA con muestras de suero para llevar a cabo el diagnóstico de infección con *T. cruzi* en gestantes de zona endémica.

No es recomendable continuar con el tamizaje de gestantes que viven en zona endémica para Chagas a partir de muestras obtenidas en papel filtro dada la mala reproducibilidad encontrada.

BIBLIOGRAFIA

Abbas A, Lichtman A, Pober J. Inmunología celular y molecular. Capítulo XV El sistema de complemento. Editorial Interamericana McGraw-Hill. 1999. P 349-70.

Aguilar V. Reacciones de aglutinación. Gac Méd Méx. 2004; 140 (3): 50-2.

Altman DG. Assessing new methods of clinical measurement. Br J Gen Pract. 2009; 59 (563):399-400.

Angulo VM. Aspectos ecológicos de la enfermedad de Chagas en el oriente de Colombia. Revista MVZ de Córdoba. 2000; 5 (1): 64-8.

Anthony R, Johnson C, Sousa O. Use of micro-ELISA for quantitating antibody to *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. Am J Trop Hyg. 1979; 28 (6): 969-73.

Apt W, Zulantay I, Solari A, Ortiz S, Oddo D, Corral G, et al. Vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* in the Providece of Choapa, IV Region, Preliminary Report (2005-2008). Biol Res. 2010; 43(3): 269-74.

Apt W, Heitmann G, Jeric I, Jofré L, Muñoz C, Noemí I. Guías clínicas de la enfermedad de Chagas 2006: Parte V. Diagnóstico de laboratorio. Rev Chil Infec. 2008; 25 (5): 379 – 83.

Araujo AB, Castagno VD, Gallina T, Bern ME. Prevalence of Chagas disease among pregnant women in the southern región of Rio Grande do Sul. Rev Soc Bras Med Trop. 2009; 42 (6): 732-3.

Barnhart H, Williamson J. Weighted least-squares approach for comparing correlated kappa. Biometrics. 2002; 58: 1012 – 19.

Basombrío M, Besuschio S, Cossio P. Side effects of immunization with live attenuated *Trypanosoma cruzi* in mice and rabbits. Infect Immun. 1982; 36 (1): 342 – 50.

Behrend M, Beltrán M, Restrepo M, Kroeger A. Control of Chagas disease in blood banks in Colombia. Biomédica. 2002; 22(1): 39-45.

Beltrán M, Bermúdez MI, Forero MC, Ayala M, Rodríguez MJ. Control of *Trypanosoma cruzi* infection in blood donors in Colombia, 2003. Biomédica. 2005; 25(4):527-32.

Bern C, Montgomery SP, Herwaldt B, et al. Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States: a systematic review. *JAMA*. 2007; 298: 2171–81.

Bern C, Verastegui M, Gilman R, Lafuente C, Galdos G, Calderón M, et al. Congenital *Trypanosoma cruzi* transmission in Santa Cruz, Bolivia. *Clin Infect Dis*. 2009; 49: 1667-74.

Bittencourt A. Transmissao vertical da doenca de Chagas. *Revista de Patología Tropical*. 2000; 29 (supl): 101 – 3.

Blanco SB, Segura EL, Cura EN, Chuit R, Tulián L, Flores I, et al. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: an operational outline for detecting and treating infected infants in north-western Argentina. *Trop Med Int Health*. 2000; 5(4): 293-301.

Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM, et al. Towards complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: The STARD Initiative. *Ann Intern Med*. 2003; 7;138 (1):40-4.

Breinere SF, Carrasco R, Miguez H, Lemestre JL, Carlier Y. Comparisons of immunological tests for serodiagnosis of Chagas disease in Bolivian patients. *Trop Geogr Med*. 1985; 37: 231-8.

Brutus L, Scheider D, Postigo J, Romero M, Santalla J, Chippaux JP. Congenital Chagas disease: diagnostic and clinical aspects in an área without vectorial transmission, Bermejo, Bolivia. *Acta Trop*. 2008;106 (3): 195-9.

Burgueño MJ, García-Bastos JL, González-Buitrago JM. Las curvas ROC en la evaluación de las pruebas diagnósticas. *Med Clin (Barc)*. 1995 ; 104 (17): 661 – 70.

Camargo M. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American Trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev Inst Med Trop*. 1966; 8 (5): 227-34.

Campos Y, Briceño L, Reina K, Figarella K, Pérez JL, Mosca W. Serological diagnosis of Chagas disease: evaluation and characterisation of a low cost antigen with high sensitivity and specificity. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104 (6): 914 -7.

Cannova D, Aguilar M, Pacheco M, Simona M, Medina M. Validación del Inmunoensayo enzimático (ELISA) y hemaglutinación indirecta (HAI) para el serodiagnóstico de la enfermedad e Chagas. *Salus* 2002; 6:4-9.

Carnero-Pardo C. Evaluación de las pruebas diagnósticas. *Rev Neurol*. 2005; 40 (11): 641 – 3.

Castañeda G. Estudio de la prevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en parturientas en el Hospital Universitario Ramón González Valencia determinación de la incidencia de Chagas congénito en hijos de madres. Trabajo de Tesis para optar al título de ginecóloga. Universidad Industrial de Santander. 1995.

Castillo D, Wolff M. Aspectos del comportamiento de los triatominos (Hemiptera: Reduviidae), vectores de la enfermedad de Chagas. *Biomédica* 2000; 20:59-64.

Castillo M. Dimensión de los costos de la enfermedad de Chagas. Disponible en: <http://www.scc.org.co/libros/CHAGAS/paginas%20205-215.pdf>. Consultado el 15 de marzo de 2012.

Castillo-Riquelme M, Guhl F, Turriago B, Pinto N, Rosas F, et al. The Costs of Preventing and Treating Chagas Disease in Colombia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2(11): 1 – 11.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Congenital transmission of Chagas disease - Virginia, 2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2012; 61(26):477-9.

Cerisola A, Rabinovich A, Álvarez M, Di Corleto C, Pruneda J. Enfermedad de Chagas y la transfusión de sangre. *Bol Oficina Sanit Panam*. 1972: 203-221.

Chiari E. Chagas disease diagnosis using polymerase chain reaction, hemoculture and serologic methods. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999; 94(1): 299-300.

Chiari E, Brener Z. Contribuição ao diagnóstico parasitológico da doença de Chagas na sua fase crônica. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1966; 8:134-8.

Contreras M, Salinas P, Sandoval L, Solís F, Rojas A. Utilidad de la ELISA-IgG en muestras de sueros y eluidos de sangre en papel filtro en el inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Bol Chil Parasitol*. 1992; 47: 76 – 81.

Contreras S, Fernandez MR, Agüero F, Desse J, Orduna T. Congenital Chagas-Mazza disease in Salta, Argentina. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1999; 32 (6): 633-6.

Corredor A, Alvarez CA, Agudelo CA, Bueno M, López MC, Cáceres E, et al. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania chagasi* infection and risk factors in a Colombian indigenous population. *Rev Inst Med Trop*. 1999;41(4):229-34.

Cortés E, Rubio JA, Gaitán H. Métodos estadísticos de evaluación de la concordancia y al reproducibilidad de pruebas diagnósticas. *Rev Colomb de Obstet y Ginecol*. 2010; 61(3): 247-55.

Da Silveira J, Umezawa E, Luquetti A. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. Trends Parasitol. 2001; 17(6): 286-291.

Delacour H, Servonnet A, Perrot A, Vigezzi JF, Ramírez JM. ROC (receiver operating characteristics) curve: principles and application in biology. Ann Biol Clin. 2005; 63(2): 145 – 54.

De Meis J, Morrot A, Farias-de-Oliveira DA, Villa-Verde DM, Savino W. Differential regional immune response in Chagas disease. PLoS Negl Trop Dis. 2009; 3(7):e417.

De Rissio AM, Riarte AR, García MM, Esteva MI, Ruiz AM. Congenital *Trypanosoma cruzi* infection. Efficacy of its monitoring in an urban reference health center in a non- endemic área of Argentina. Am J Trop Med Hyg. 2010; 82 (5): 838-45.

Deyo RA, Diehr P, Patrick DL. Reproducibility and responsiveness of health status measures. Statistics and strategies for evaluation. Control Clin Trials. 1991;12: 142S - 158S.

Domhldt E. Methodological Research. Physical Research Therapy. Principles and Applications. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1993: 162 -171.

Donner A, Shoukri M, Klar N, Bartfay E. Testing the equality of two dependent kappa statistics. Statist Med. 2000; 19: 373-87.

Enciso C, Montilla M, Santacruz M, Nicholls RS, Rodríguez A, et al. Comparación de la prueba de inmunofluorescencia indirecta, un inmunoensayo enzimático y la prueba commercial Chagatek para la detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi*. Biomédica. 2004; 24: 104-8.

Evengard B & Linder E. Standardization of a filter-paper technique for blood sampling. Ann Trop Med and Parasitol. 1988; 82 (3): 295-303.

Fife E, Muschel L. Fluorescent- Antibody Technic for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. Am. Soc. of Trop. Med. and Hyg. 1959; 101:540-3.

Figueredo J, Kaneda Y, Tachibana H, Furushima R, Tateno S. Epidemiological survey of *Trypanosoma cruzi* infection in north-eastern Brazil using different diagnostic methods. Rev Inst Med Trop. 1991; 33 (3): 193-198.

Flores MD, Merino F, García S, Martín P, Merino P, et al. Surveillance of Chagas disease in pregnant women in Madrid, Spain, from 2008 to 2010. Euro Surveill. 2011; 16(38): 1-7.

Girola R, Wynne G, Mili A. La reacción de inmunofluorescencia en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas-Mazza. Bol Oficina Sanit Panam. 1968: 130-6.

Gomes M, Galvao L, Macedo A, Peña S, Chiari E. Chagas disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic molecular, and serologic methods. Am J Trop Med Hyg. 1999; 60 (2): 205-10.

Gomes Y, Lorena V, Luquetti A. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be with regard to diagnosis and follow up studies? Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104 (1): 115 – 21.

Gordis L. Más sobre las inferencias causales: sesgos, factores de confusión. En: Epidemiología tercera edición. Universidad de San Pablo CEU. Madrid. Elseiver. 2005; 224 – 238.

Guhl F, Aguilera G, Pinto N, Vergara D. Actualización de la distribución geográfica y ecoepidemiología de la fauna de triatominos (Reduviidae: Triatominae) en Colombia. Biomédica 2007; 27 (1):143-162.

Guimarães MC, Celeste BJ, De Castilho EA, Mineo JR, Diniz JM. Immunoenzymatic assay (ELISA) in mucocutaneous leishmaniasis, Kala-azar, and Chagas disease: an epimastigote *Trypanosoma cruzi* antigen able to distinguish between anti-*Trypanosoma* and anti-*Leishmania* antibodies. Am J Trop Med Hyg. 1981; 30 (5): 942 – 7.

Gutierrez R. Métodos convencionales de diagnóstico. En: Angulo VM. Curso Taller Internacional Control y Manejo de la Tripanosomiasis Americana. Bucaramanga Universidad Industrial de Santander Centro de Investigaciones Tropicales: AgrEvo; 1999. P 16-9.

Gutierrez R, Angulo VM, Tarazona Z, Britto C, Fernandes O. Comparison of four serological tests for the diagnosis of Chagas disease in a Colombian endemic área. Parasitology. 2004; 129: 439-44.

Guzmán E. Las pruebas de Elisa. Gac Méd Méx 2004; 140 (3). 48-9.

Guzmán E, Zavala J, Acosta K, Rosado M. Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*. Biomed. 1999; 10:177-84.

Hernández P, Heimann M, Riera C, Solano M, Santalla J, Luquetti A, et al. Highly effective serodiagnosis for Chagas disease. Clin Vaccine Immunol. 2010; 17(10): 1598 – 1604.

Herrera P, Duffau G. Pruebas diagnósticas: algunos aspectos cuantitativos para su desarrollo e interpretación. Rev Chil Pediatr 1995; 66 (6):335-40.

Hotez PJ, Bottazzi ME, Franco-Paredes C, Ault SK, Periago MR. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008; 2(9):e300.

Jacobson RH. Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. *Rev Sci Tech*. 1998; 17 (2): 469 – 526.

Jackson Y, Myers C, Diana A, Marti HP, Wolff H, Chappuis F, et al. Congenital transmission of Chagas disease in Latin American immigrants in Switzerland. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(4):601-3.

Kagan G, Goldsmith RS, Zárata R, Allain D. Evaluación de pruebas serológicas utilizadas para estudiar la enfermedad de Chagas. *PAHO Bulletin*.1978; 12(4): 341-8.

Kelly S, Berry E, Proderick P, Harris KM, Cullingworth J, Gathercole L, et al. The identification of bias in studies of the diagnostic performance of imaging modalities. *Br J Radiol*. 1997; 70: 1028 – 35.

Kemmerling U, Bosco C, Galanti N. Infection and invasion mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in the congenital transmission of Chagas disease: A proposal. *Biol Res*. 2010; 43: 307-16.

Kendell R, Jablensky A. Distinguishing Between the Validity and Utility of Psychiatric Diagnoses. *Am J Psychiatry*. 2003; 160: 4 – 12.

Kraemer H. Sensitivity and Specificity: The Signal Detection Approach. Evaluating medical test: Objective and Quantitative Guidelines. 1th ed. California: Sage Publications. 1992. P 63 – 94.

Kraemer H. Predictive Value: The Bayesian approach, Risk ratios and Odds ratios. Evaluating medical test: Objective and Quantitative Guidelines. 1th ed. California: Sage Publications.1992. P 96 – 113.

Kraemer H, Periyakoil VS, Noda A. Kappa coefficients in medical research. *Stat Med*. 2002;21(14):2109-29.

La Fuente C, Urjel R, Darras C, Saucedo E. Uso de tubos de microhematocrito para el diagnóstico rápido de la enfermedad de Chagas y malaria. *Ann Soc Belge Med Trop*. 1985; 1: 95-9.

Latour J, Abaira V, Cabello JB, Lopez SJ. Investigation methods in clinical cardiology. IV. Clinical measurements in cardiology: validity and errors of measurements. *Rev Esp Cardio*. 1997; 50(2):117-28.

Lemestre JL, Afchain D, Orozco O, Loyens M, Breniere FS, Desjeux P, et al. Specific and sensitive immunological diagnosis of Chagas disease by competitive antibody enzyme immunoassay using a *Trypanosoma cruzi*-specific monoclonal antibody. *Am J Trop Med Hyg*. 1986; 35 (1): 86 – 93.

López M, Duque S, Orozco LC, Camargo D, Gualdrón L, Cáceres E, et al. Inmunodiagnóstico de la infección chagásica por ELISA. *Biomédica*. 1999; 19 (2): 159 – 63.

Lorca M, Thiermann E. Valor diagnóstico de la inmunofluorescencia indirecta con anti-IgM para Enfermedad de Chagas, en adultos y recién nacidos *Rev Chile Pediatr*. 1982; 53:199-203.

Lorenzano C. La enfermedad de Chagas-Mazza, un mal latinoamericano. *Revista Investigación y desarrollo*. 1996; 5: 1-16.

Loureiro de Souza S, Camargo M. The use of filter paper blood smears in a practical fluorescent test for american tripanosomiasis serodiagnosis. *Rev Inst Med Trop*. 1966; 8: 255 – 8.

Luquetti A. Evolution of knowledge on the etiological diagnosis of chagásica infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999; 94(1): 283-4.

Malan A, Avelar E, Litwin S, Hill H, Litwin C. Serological diagnosis of *Trypanosoma cruzi*: evaluation of three enzyme immunoassays and an indirect immunofluorescent assay. *J Med Microbiol*. 2006; 55: 171-8.

Martínez-Cambor P. Comparación de pruebas diagnósticas desde la curva ROC. *Revista Colombiana de Estadística*. 2007; 30 (2): 163 – 76.

Mathers CD, Ezzati M, Lopez AD. Measuring the burden of neglected tropical diseases: the global burden of disease framework. *PLoS Negl Trop Dis*. 2007;1(2):e114.

Mendoza CA, Córdova E, Ancca J, Saldaña J, Torres A, et al. Prevalencia de la enfermedad de Chagas en púerperas y transmisión congénita en una zona endémica del Perú. *Rev Panam Salud Publica*. 2005; 17(3): 147–53.

Monteon V, Sosa T, Reyes P. Serological test for American trypanosomiasis a comparative study. *Lat-amer Microbiol*. 1989; 31: 35 – 8.

Molina Z, Rosales J, Galaviz L, Molina D. Prevalencia de *Trypanosoma cruzi* En triatomos silvestres de Nuevo León, México. Salud Pública Mex. 2007; 49 (1):37-44.

Montiel G, Díaz G. Respuesta inmune de las células del hospedero a la infección por *Trypanosoma cruzi*. Rev méd Hosp Nac. 2002; 37: 1-2.

Morocoima A, Tineo-Brito E, Ferrer E, Herrera L, Núñez M. Enfermedad de Chagas en el estado de Anóategui, Venezuela: Registro de un caso agudo y caracterización parasitológica y molecular del aislado. Boletín de Malariología y salud ambiental. 2008; 48 (2): 121 – 6.

Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1989; 27:1477–82.

Mulherin S, Miller W. Spectrum bias or spectrum effect? Subgroup variation in diagnostic test evaluation. Ann Intern Med. 2002; 137: 598 – 602.

Nilsson LA, Voller A. A comparasion of thin layer immunoassay (TIA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1982; 76 (1): 95-7.

Ochoa C, Orejas G. Epidemiología y metodología científica aplicada a la pediatría (IV): Pruebas diagnósticas. An Esp Pediatr. 1999; 50 :301-14.

Organización Mundial de la Salud. 62º Asamblea Mundial de la Salud A62/17. Enfermedad de Chagas: control y eliminación. 20 de marzo de 2009.

Organización Mundial de la Salud. 63º Asamblea Mundial de la Salud A63/17. Enfermedad de Chagas: control y eliminación. 22 de abril de 2010.

Organización Mundial de la Salud. Preguntas y respuestas en línea. 19 de enero de 2012. Disponible en <http://who.int/features/qa/58/es/index.html>. Consultado el: 13 de marzo de 2012.

OMS/OPS. Consulta técnica sobre información educación y comunicación (IEC) en enfermedad de Chagas congénita. CLAP, Montevideo, Uruguay, 17 y 18 de mayo de 2007.

Organización Panamericana de Salud. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. 2006. Disponible en: www.bvsops.org.uy/pdf/chagas19.pdf. Consultado el: 13 de marzo de 2012.

Orozco LC 2010. Fases y Muestreos, o de cómo tomar las personas de una población para hacer el estudio. En: Medición en Salud Diagnóstico y Evaluación de Resultados Un manual crítico más allá de lo básico. Bucaramanga: División de publicaciones UIS; 2010. P 63 – 72.

Orozco LC 2010. Medición en Salud Diagnóstico y Evaluación de Resultados Un manual crítico más allá de lo básico. Bucaramanga: División de publicaciones UIS; 2010. P73 – 103.

Orozco LC, Camargo D. El diagnóstico serológico de infección por *T. cruzi*. En: Angulo VM. Curso Taller Internacional Control y Manejo de la Tripanosomiasis Americana. Bucaramanga Universidad Industrial de Santander Centro de Investigaciones Tropicales: AgrEvo; 1999. 25 – 7.

Orozco L, Camargo D. Evaluación de tecnologías diagnósticas y tipos de muestreos. Biomédica, 1997;7:321-4.

Orozco LC, Camargo D, López M, Duque S, Gualdrón L, Cáceres E, et al. Inmunodiagnóstico de la infección en humanos por *Trypanosoma cruzi* mediante ELISA utilizando sangre recolectada en papel filtro. Biomédica. 1999; 19 (12): 164 – 8.

Palacios X, Belli A, Espino AM. Detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en Somoto, Nicaragua, mediante ELISA indirecto e IFI en muestras de sangre en papel de filtro. Rev Panam Salud Pública. 2000; 8(6): 411-17.

Palau M. Relación hospedero-parásito *Trypanosoma cruzi*. Revista MVZ-Córdoba 2000; 5: (1), 33-37.

Pan A, Rosenberg B, Hurley M, Schock G, Chu V, Aiyappa A. Clinical evaluation of an EIA for the sensitive and specific detection of serum antibody to *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease). JID. 1992; 165: 585 – 8.

Paricio-Talayero JM, Benlloch-Muncharaz MJ, Collar-del-Castillo JI, Rubio-Soriano A, Serrat-Pérez C, Magraner-Egea J, et al. Epidemiological surveillance of vertically-transmitted Chagas disease at three maternity hospitals in the Valencian Community. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2008; 26(10):609-13.

Pavía P, Montilla M, Flórez C, Herrera G, Ospina JM, Manrique F, et al. Reporte del primer caso de enfermedad de Chagas transplacentaria analizado por AP-PCR en Moniquirá, Boyacá. Biomédica. 2009; 29: 513-22.

Petray P, Bonardello N, Clark R, Agranatti M, Corral R, Grinstein S. Evaluación del método de ELISA para detección de antígenos y complejos inmunes circulantes de

Trypanosoma cruzi a través de un estudio de campo en una zona endémica de Argentina. Rev Inst Med Trop. 1992; 34(2):141-7.

Portela-Lindoso AA, Shikanai-Yasuda MA. Doença de Chagas crónica: do xenodiagnóstico e hemocultura a reação em cadeia da polimerase. 2003; 37 (1): 107 – 15.

Ramírez LD; Brener Z. Evaluation of the rabbit as a model for Chagas disease I. Parasitological studies. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1987; 82 (4): 531 – 6.

Rassi A, Amato Neto V, Rassi GG, Amato VS, Rassi JA, et al. A retrospective search for maternal transmission of Chagas infection from patients in the chronic phase. Rev Soc Bras Med Trop. 2004; 37 (6): 485-9.

Rodriguez AM, Santoro F, Afchain D, Bazin, Capron A. *Trypanosoma cruzi* infection in B- Cell- deficient rats. Infection and Immunity. 1981; 31 (2): 524-9.

Roldán JA, Luna JD. Comparison of weighted kappa coefficients of multiple binary diagnostic tests done on the same subjects. Statist Med. 2010; 29: 2149 – 65.

Romero M, Postigo J, Schneider D, Chippaux JP, Santalla JA, Brutus L. Door-to-door screening as a strategy for the detection of congenital Chagas disease in rural Bolivia. Trop Med Int Health. 2011;16(5):562-9.

Ross A, Novoa D. Comparability and reliability of ELISA, Immunofluorescence, and Indirect Hemagglutination assays for *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. JID. 1993; 168: 1581- 4.

Rossi M, Sigales L, Zapata D. Inmunoensayo de capa fina (ICF) en el serodiagnóstico de tripanosomiasis bovina causada por el *Trypanosoma vivax*. Rev Fac Cs Vets. 2008; 49 (2): 81-9.

Ruiz J. Historia de la enfermedad de Chagas. Gac Med Bol. 2007; 30 (2): 70-3.

Rutjes AW, Reitsma JB, Coomarasamy A, Khan KS, Bossuyt PM. Evaluation of diagnostic tests when there is no gold standard. A review of methods. Health Technol Assess. 2007 ;11(50):iii, ix-51.

Russomando G. Transmisión congénita de la enfermedad de Chagas en el Paraguay. Mem Inst Investig Cienc Salud. 2009; 7 (2): 55 – 64.

Russomando G, Sanchez Z, Meza G, Guillen Y. Shed acute-phase antigen protein in an ELISA system for unequivocal diagnosis of congenital Chagas disease. Expert Rev Mol Diagn. 2010; 10 (6): 705-7.

Sadun EH, Duxbury RE, Williams JS, Anderson RI. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of African and American trypanosomiasis in Man. *J Parasitol.* 1963; 49 (3): 385 - 8.

Seigel D, Podgor M, Remaley A. Acceptable values of kappa for comparison of two groups. *Am J Epidemiol.* 1992; 135 (5): 571-8.

Schattschneider W, Lopes ER, De Alencar JE, Bienzle U, Feldmeier. A comparative study of four serological methods for diagnosis of acute and chronic Chagas disease in Brazilian patients. *Trop Geogr Med.* 1992; 44: 210 -18.

Schechter M, Voller A, Marinkelle CJ, Flint JE, Guhl F, Miles MA. Purified *Trypanosoma cruzi* specific glycoprotein for discriminative serological diagnosis of south American trypanosomiasis (Chagas disease). *Lancet.* 1983; 939 – 41.

Schijman A, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T. et al. International Study to Evaluate PCR Methods for Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. *Plos Negl Trop Dis.* 2011; 5(1): 1-13.

Schmunis AG. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102 (1):75-85.

Schofield C, Chris J, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol.* 2006; 22 (12): 583-8.

Shrout P, Fleiss J. Intraclass Correlations: uses in assessing rater reliability. *Psychol Bull.* 1979; 86 (2): 420-8.

Sosa-Estani S, Colantonio L, Segura EL. Therapy of chagas disease: implications for levels of prevention. *J Trop Med.* 2012;2012:292138.

Sosa-Estani S, Gamboa-León MR, Del Cid-Lemus J, Althabe F, Alger J, Almendares O, et al. Use of a rapid test on umbilical cord blood to screen for *Trypanosoma cruzi* infection in pregnant women in Argentina, Bolivia, Honduras, and Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;79(5):755-9.

Spencer H, Allain D, Sulzer A, Collins W. Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Trypanosoma cruzi*. *A J Trop Med.* 1980; 9 (2): 179 – 82.

Streiner DL, Norman GR. Validity. *Health Measurement Scales. A Practical Guide to Their Development and Use.* New York: Oxford University Press; 2008. P 247 – 276.

Suárez N, Cabrera R, Cartagena L, Ayaqui R. Características biológicas de una cepa de *Trypanosoma cruzi* en un modelo murino y análisis de supervivencia. Rev Perú Med Exp Salud Pública. 2009; 26 (2): 187 – 92.

Szklo M, Nieto J. Falta de Validez: Sesgo. In: Szklo M, Nieto J, editors. Epidemiología Intermedia. Conceptos y Aplicaciones. Madrid: Díaz de Santos; 2003. P. 109 - 153.

Toso A, Vial F, Galanti N. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. Rev Med Chile. 2011; 139 (2): 258-66.

Vanbelle S, Albert A. A bootstrap method for comparing correlated kappa coefficients. Journal of Statistical Computation & Simulation. 200x: 1-15.

Vázquez S, Fernández R, Llorente C. Utilidad de sangre almacenada en papel filtro para estudios serológicos por ELISA de inhibición. Rev Inst Med trop. 1991; 33 (4): 309 – 11.

Villegas VE, Sánchez MC, Chuairé L. Reacción en cadena de la polimerasa y diagnóstico molecular. Colombia Médica. 2009; 40 (3): 347 – 52.

Virreira M, Torrico F, Truyens C, Alonso-Vega C, Solano M, Carlier Y, et al. Comparation of Polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. Am J Trop Med and Hyg. 2003; 68 (5): 574 – 82.

Virreira M, Truyens C, Alonso-Vega C, Brutus, Jijena J, Torrico F. Comparison of *Trypanosoma cruzi* Lineages and Levels of Parasitic DNA in infected mothers and their newborns. Am J Trop Med and Hyg. 2007; 77 (1): 102 – 6.

Voller A, Bartlett A, Bidwell DE. Enzyme immunoassays for parasitic diseases. Trans Roy Soc Trop Med and Hyg 1976; 70(2): 98-106.

Williamson J, Manatunga A. Modeling kappa for measuring dependent categorical agreement data. Biostatistics 2000; 1 (2): 191 – 202.

Willis B. Spectrum bias- why clinicians need to be cautious when applying diagnostic test studies. Family Practice. 2008; 25: 390-6.

World Health Organization. Consultation on International Biological Reference Preparations for Chagas Diagnostic Tests. WHO, Geneva, 2–3 July 2007.

Yoshida N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. An Acad Bras Cienc 2006; 78 (1): 87-111.

Zaidenberg M, Segovia A. Congenital Chagas disease in the city of Salta, Argentina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1993;35(1):35-43.

Zaidenberg A, Tournier H, Schinella G, Buschiazzi H. *Trypanosoma cruzi*: Obtención de amastigotes extracelulares y estudio de su crecimiento en diferentes condiciones de cultivo. *Rev Latinoam Microbiol*. 2000; 42:21-6.

Zicker F, Smith PG, Luquetti AO, Oliveira OS. Mass screening for *Trypanosoma cruzi* infections using the immunofluorescence, ELISA and haemagglutination tests on serum samples and on blood eluates from filter- paper. *Bull World Health Org*. 1990; 68 (4): 465-71.

Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem*. 1999;39(4):561-77.

ANEXOS

ANEXO A. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERATIVA	NATURALEZA	ESCALA DE MEDICIÓN	VALORES QUE ASUME
Edad	Tiempo que ha vivido una persona	Años cumplidos hasta el día en que diligencia el cuestionario y se toma la muestra	Cuantitativa	Razón	13 a 49 años
Municipio de residencia	Municipio donde reside la gestante	Municipio donde reside la gestante, se realiza el control prenatal e ingresa al estudio	Cualitativa	Nominal	Capitanejo Charalá Concepción Coromoro Curiti Enciso Gámbita Guacamayo Hato Macaravita Málaga Mogotes Molagavita Oiba Onzaga Palmas del Socorro San Joaquín San José de

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERATIVA	NATURALEZA	ESCALA DE MEDICIÓN	VALORES QUE ASUME
					Miranda San Miguel San gil Simacota Socorro Suaita
Lugar de residencia	Zona donde habita la persona	Zona geográfica donde está localizada la vivienda de la gestante	Cualitativa	Nominal	Rural =1 Urbano =2
Escolaridad	Conjunto de cursos que un estudiante sigue en un plantel educativo	Ultimo nivel de estudio matriculado, cursado y aprobado por la gestante a la fecha del ingreso al estudio	Cualitativa	Ordinal	Postgrado=6 Universitario=5 Tecnólogo=4 Secundaria=3 Primaria=2 Ninguna=1
Estado civil	Conjunto de situaciones jurídicas por las que se relacionan las personas con su familia de procedencia, o que han formado, y con elementos de personalidad jurídica.	Condición jurídica que tiene la gestante al momento de participar en el estudio	Cualitativa	Nominal	Casada=0 Unión libre=1 Soltera=2 Separada=3 Viuda=4
Estrato socioeconó	Instrumento para clasificar los inmuebles residenciales de	Condición socioeconómica de la gestante que acepta participar en el	Cualitativa	Ordinal	1=1 2=2

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERATIVA	NATURALEZA	ESCALA DE MEDICIÓN	VALORES QUE ASUME
mico	acuerdo con los lineamientos del DANE, lo que determina los impuestos y tarifas en servicios públicos	estudio de acuerdo con lo registrado en el carne del Sisben, el cual debe ser presentado al momento del diligenciamiento del cuestionario y la toma de muestra			3=3 4 =4 5=5 6=6
Ocupación	Trabajo, empleo u oficio que desempeña una persona	Actividad realizada por la gestante durante su periodo gestacional	Cualitativa	Nominal	Hogar=1 Oficina=2 Fábrica=3 Comercio=4 Agricultura=5 Caza-Pesca=6 Ganadería=7 Otro=8
ELISA	Prueba serológica que emplea un antígeno en fase sólida para detección de anticuerpos presentes en sangre, mediante lectura de absorción	Resultado de la prueba serológica ELISA reportado por el Laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Salud	Cuantitativa	Continua	0,0 a 4,0
IFI	Prueba serológica que emplea parásitos fijos a una lámina. Mediante la adición de conjugado con fluoresceína se	Resultado de la prueba serológica IFI reportado por el Laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Salud	Cuantitativa	Razón	1/16 a 1/1024

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERATIVA	NATURALEZA	ESCALA DE MEDICIÓN	VALORES QUE ASUME
	observan los parásitos en microscopio de fluorescencia				
HAI	Prueba serológica en la que la aglutinación ocurre por los anticuerpos presentes en la muestra a analizar	Resultado de la prueba serológica IFI reportado por el Laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Salud	Cuantitativa	Razón	1/8 a 1/128

ANEXO C. CONSENTIMIENTO INFORMADO



DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO (a)

Apreciada señora:

Queremos invitarla a participar voluntariamente en el estudio titulado "Desarrollo e implementación de un programa piloto de vigilancia de Chagas Congénito en cinco departamentos de Colombia", para lo cual solicitamos su autorización.

Este documento, que le entregaremos para que lo conserve, contiene la información necesaria para que usted pueda decidir libremente si desea participar en el estudio. A continuación lo leeremos a usted y le solicitamos el favor de que escuche cuidadosamente y haga todas las preguntas que estime convenientes antes de informarnos su decisión.

-¿Qué es la enfermedad de Chagas?

La enfermedad de Chagas es una enfermedad producida por un parásito llamado *Trypanosoma cruzi*, que es transmitido por un insecto que vive en las casas de paredes de bahareque y techos de paja en algunas áreas de Colombia. Al insecto transmisor se le conoce popularmente como "pito". La enfermedad puede también transmitirse de la madre infectada a su bebé mientras ella está embarazada. Cuando el bebé está infectado, usualmente nace sano, pero en su juventud ó cuando es un adulto el parásito puede afectar su corazón. Sin embargo, si se detecta y trata a tiempo, se puede curar la infección y evitar así que los bebés infectados tengan problemas del corazón causados por el parásito.

-¿Qué deseamos hacer?

El Grupo de Parasitología del Instituto Nacional de Salud, el Grupo de Enfermedades Infecciosas de la Universidad Javeriana y la Secretaría Departamental de Salud están interesados en conocer cuál es la magnitud de la enfermedad de Chagas en los bebés de madres embarazadas que están infectadas con el parásito.

-¿Cómo haremos el estudio y cómo sería su participación en él?

Para poder realizar el estudio deseamos hacer lo siguiente:

A todas las mujeres embarazadas les tomaremos una pequeña muestra de sangre venosa y en papel de filtro con el fin de ver si usted tiene anticuerpos contra el parásito. La toma de esta muestra no representa ningún riesgo ni para su integridad física ni para la de su bebé siendo el único efecto colateral probable un leve

dolor en el sitio de la punción. Esta muestra no será utilizada para ningún otro estudio sin su consentimiento. El día de la toma de muestra haremos a usted una encuesta para conocer si usted pudo haber estado expuesta al riesgo de tener la infección.

Los resultados de esta prueba les serán entregados y no serán divulgados a su nombre sin una autorización escrita de su parte.

En caso de tener la infección, tanto a Usted a su hijo recién nacido les serán tomadas muestras de sangre por una persona entrenada para tal fin que proporcione al recién nacido y la madre máxima seguridad. La muestra de sangre venosa se tomará del brazo izquierdo, de 5 centímetros cúbicos en su caso y sangre de cordón umbilical al momento del nacimiento o un volumen de sangre venosa de 2 c.c. a la edad de 0 a 10 días de nacimiento de su bebé. La toma de esta muestra tampoco representa ningún riesgo ni para su integridad física ni para la de su bebé siendo el único efecto colateral probable la aparición de un hematoma ó chichón en el sitio de la punción venosa.

Estas muestras serán usadas para realizar varias pruebas de laboratorio, incluyendo hemocultivo, microhematocrito, PCR e IFI, para detectar la presencia del parásito tanto en usted como en su bebé. Las muestras no serán utilizadas para ningún otro estudio sin su consentimiento y los resultados les serán entregados personalmente y no podrán ser divulgados a su nombre sin su autorización escrita.

El tiempo transcurrido entre la toma de muestra de sangre y el procesamiento de la misma en Bogotá, es un estimado máximo de cuatro semanas. Los resultados del cultivo pueden tardar hasta seis meses. Los resultados de microhematocrito, y pruebas serológicas se obtendrán en un máximo de tiempo de dos semanas.

En caso de que en las muestras de su bebé recién nacido no se pueda demostrar la infección con estas muestras, se le tomará una muestra de sangre adicional entre los 9 y 12 meses de edad para buscar si hay infección en él mediante detección de anticuerpos en su sangre.

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO (b)

En caso de que su bebé este infectado con el parásito, le será administrado el tratamiento (Nifurtimox o Lampit®) tan pronto se confirme la infección mediante los resultados de las pruebas de laboratorio, de manera oportuna y vigilada tanto por el médico como por los exámenes de laboratorio y de diagnóstico.

A las madres infectadas, serán remitidas a su EPS, para valoración médica y evaluación de la necesidad de tratamiento sintomático y/o anti-parasitario una vez haya terminado su embarazo y suspendido la lactancia.

También se realizará búsqueda de infección en sus otros hijos, mediante toma de muestras para realización de pruebas serológicas.

-Riesgos de su participación en el estudio.

La toma de muestras de sangre no representa ningún riesgo ni para su integridad física ni para la de su bebé siendo el único efecto colateral probable un leve dolor en el sitio de la punción, en el caso de la muestra que se toma del dedo, ó un leve dolor y en ocasiones un hematoma (chichón) en el caso de la muestra que se toma del brazo.

- Beneficios de su participación en el estudio.

Todas las pruebas de laboratorio que se realizarán a usted y a su bebé, así como el medicamento que se la administrará en caso de necesitarlo, serán gratis. Ni usted ni su familia tendrán que pagar por ellos.

Si usted ó su hijo fueran identificados como infectados por el parásito *Trypanosoma cruzi*, les será suministrado el medicamento disponible en Colombia, que en este momento es Nifurtimox, según las indicaciones de la OPS. Este medicamento no tiene ningún costo para usted ni para su familia. La vía de administración del medicamento es oral, por 60 días. Este medicamento tiene una alta tasa de curación, especialmente en etapas recientes de infección, como es el caso de los recién nacidos y evitan el desarrollo de una posterior cardiopatía chagásica. Los principales efectos adversos relacionados con este medicamento, tanto en adultos como en niños son: hiporexia (disminución de apetito), náuseas, disminución de peso y dolor de cabeza. El suministro del medicamento y el seguimiento de los posibles efectos adversos serán supervisados directamente por parte del personal participante en este proyecto (tanto clínicamente como con paraclínicos cada 15 días) y se garantizará la medición de la eficacia del medicamento cada 6 meses, y durante la

duración del proyecto. Posteriormente, se remitirá al Sistema de Aseguramiento correspondiente para continuar ese seguimiento varios años más.

-Utilización de las muestras para estudios adicionales:

Las muestras tomadas no serán utilizadas para ningún otro estudio.

-Derechos de los participantes

Su participación y la de su hijo es completamente libre, voluntaria y gratuita. Si usted(es) decide(n) rechazar esta invitación a participar ó retirarse voluntariamente del estudio en cualquier momento, ello no afectará la atención que usted(es) ó su niño reciban en las entidades de salud, ni perderán ninguno de los beneficios que les corresponde por Ley. Toda la información acerca de usted(es) y su niño será guardada en forma confidencial y anónima. Sólo el personal a cargo del estudio y el Comité de Ética que lo supervisará podrá tener acceso a sus datos personales, ó a los de su hijo.

-Personas que pueden darle información adicional

Si usted ahora ó en cualquier otro momento desea hacer una consulta sobre el estudio puede contactar a las siguientes personas:

Zulma M. Cucunubá, Teléfono: 2207700 ext. 1316, 1321, Bogotá, D.C., Colombia.
Correo-e: zcucunuba@ins.gov.co

Concepción J. Puerta. Teléfono: 3208320, ext. 4024, 4222, 4023 Bogotá D.C., Colombia.
Correo-e: cpuerta@javeriana.edu.co

-Protección de sus derechos y seguridad

Para garantizar la protección de los derechos y seguridad suyos y de su hijo, este estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Salud y el Comité de Ética de la Pontificia Universidad Javeriana.

Si usted desea hacer alguna consulta acerca de sus derechos ó de los derechos de su hijo (a) como participante en el estudio, sírvase contactar al Comité de ética del Instituto Nacional de Salud, Dr. Luis Alberto Gómez, Teléfono, 2207700 ext. 1108



DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Si usted(es) autoriza(n) su participación y, en caso necesario, la de su bebé en este estudio, por favor complete(n) los siguientes datos y conserve(n) una copia de este documento.

Yo, _____
Nombre completo de la madre que otorga el consentimiento

Yo, _____
Nombre completo del padre que entrega el consentimiento

Declaro(amos) que se me (nos) han leído y explicado detalladamente los objetivos y los procedimientos y todos los aspectos relacionados con este estudio y que tuve(imos) la posibilidad de hacer preguntas para aclarar mis (nuestras) dudas.

Acepto(amos) voluntariamente mi (nuestra) participación en el estudio y, en caso necesario, acepto(amos) voluntariamente que mi (nuestro) bebé participe en el estudio.

Firma de la madre

Cédula de Ciudadanía No. _____ Cédula de Ciudadanía No. _____

Fecha: Día (____) Mes (____) Año (____)

Nombre completo del profesional que obtuvo el consentimiento

Firma del profesional que obtuvo el consentimiento

Cédula de Ciudadanía No. _____

Fecha: Día (____) Mes (____) Año (____)

Testigo 1
Nombre: _____

Testigo 2
Nombre: _____

Firma: _____

Firma: _____