

EVALUACION DE UN NUEVO KIT ELISA RECOMBINANTE PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-*T. CRUZI*

Felcaro MV, Toplikar E, Medrano G, Ríos M, Vila MS, García M, Chacón G, Capriotti G y Torruella M.
Centro de Investigación y Biotecnología, WIENER LAB, Rosario, Argentina.
E-mail: mfelcaro@wiener-lab.com.ar

La enfermedad de Chagas o «Tripanosomiasis americana» afecta cerca de 16 a 18 millones de individuos en Latinoamérica (según OMS). El agente etiológico es el *Trypanosoma cruzi*, un protozoo flagelado. El diagnóstico de laboratorio



depende del estadio en el cual se encuentre la enfermedad. Durante la fase aguda, se efectúa directamente mediante la comprobación de los parásitos en sangre o por métodos inmunológicos que detecten anticuerpos de clase IgM. Durante la fase crónica, se pueden utilizar métodos inmunológicos como hemaglutinación, inmunofluorescencia, ensayo inmunoenzimático o western blot.



Objetivo

Evaluar la performance del kit Chagatest ELISA recombinante v.4.0 desarrollado por Wiener lab. y, determinar su aplicabilidad en el tamizaje y diagnóstico de la infección por *T. cruzi*.

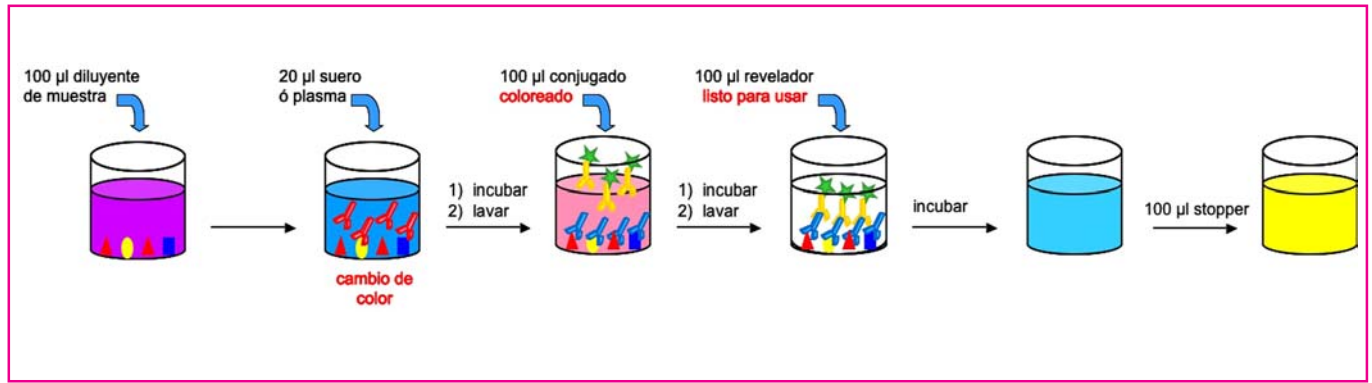
Materiales y Métodos

Técnica

Chagatest ELISA recombinante v. 4.0 es un ensayo inmunoenzimático *in vitro* para la detección cualitativa de anticuerpos anti-*T. cruzi* en muestras de suero o plasma humano. Este nuevo ELISA

utiliza pocillos sensibilizados con antígenos recombinantes, conjugado monoclonal y revelador único. Además posee sistema de monitoreo de agregado de muestras y control de las distintas etapas operativas ya que sus reactivos son coloreados.

TECNICA	
Diluyente de Muestra	100 ul
Muestra y Controles	20 ul
Incubación	60 ± 2 minutos a 37°C ± 1°C
Lavados	5 (300 ul/well)
Conjugado diluido	100 ul
Incubación	30 ± 2 minutos a 37°C ± 1°C
Lavados	5 (300 ul/well)
Revelador	100 ul
Incubación	30 ± 2 minutos a 37°C ± 1°C
Stopper	100 ul
Lectura	450/620-650 nm



Sensibilidad

La sensibilidad fue evaluada con paneles de performance internacionales, muestras pediátricas y de adultos infectados.

SENSIBILIDAD			
Paneles de Performance Internacionales			
PANELES	ORIGEN	MUESTRAS REACTIVAS DETECTADAS	% SENSIBILIDAD
PMT 201	BBI, USA	14/14	100%
PP 0404	Q Panel, Brasil	16/16	100%
PP 0405	Q Panel, Brasil	16/16	100%
PP 0406	Q Panel, Brasil	16/16	100%
Paneles de muestras reactivas			
Muestras pediátricas	Zona endémica	100/100	100%
Muestras hospitalarias	Rosario	115/116	99,14%

Especificidad

La especificidad fue evaluada con muestras provenientes de banco de sangre, de distintos centros de salud, de población de alta prevalencia y de pacientes con diferentes condiciones clínicas que pueden generar reacciones cruzadas (mujeres embarazadas, pacientes hemodializados, enfermedades autoinmunes, HIV, HTLV, Hepatitis C, Hepatitis B, Sífilis, otras).

ESPECIFICIDAD	
MUESTRAS	ESPECIFICIDAD
1192 muestras de Banco de Sangre	99,66%
477 muestras de Centros de Salud diferentes	99,57%
474 muestras de población de alta prevalencia	98,30%
491 muestras con diferentes condiciones clínicas	98,37%

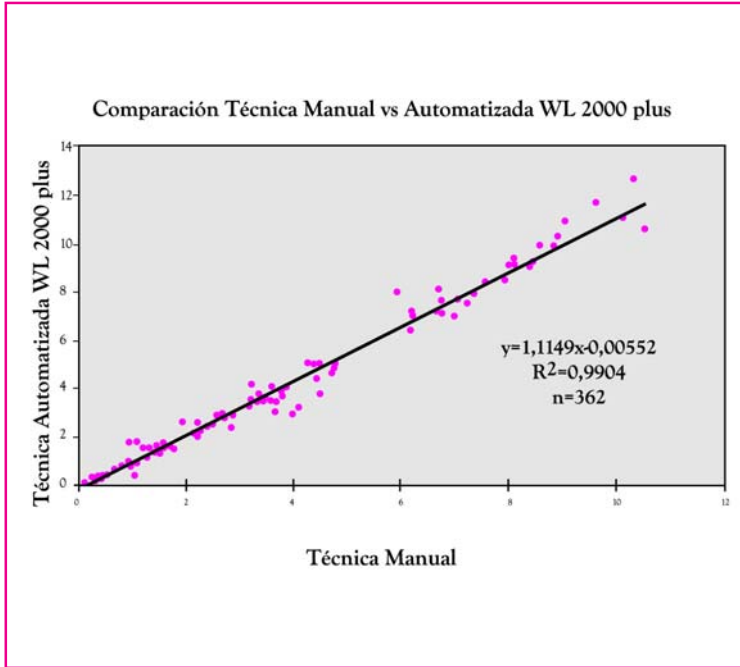
PRECISION	Media	Intra-ensayo		Total	
	DO/CO	S	CV	S	CV
Muestra 1	0,36	0,029	8,07%	0,043	11,90%
Muestra 2	0,55	0,036	6,55%	0,055	10,01%
Muestra 3	0,87	0,063	7,23%	0,093	10,69%
Control Positivo	1,75	0,085	4,83%	0,138	7,89%
Control Negativo	0,028	0,003	10,35%	0,004	14,24%

Precisión

Se evaluó la precisión del test siguiendo el protocolo EP5A recomendado por la NCCLS. Los ensayos fueron realizados con muestras de diferentes niveles de reactividad y con los controles. Se realizaron 2 ensayos diarios evaluando cada muestra por duplicado por el transcurso de 20 días (n = 80).

n = 80

AUTOMATIZACION



Cut-off

La definición del cut-off se realizó siguiendo el protocolo EP17A recomendado por la NCCLS.

Automatización

Se evaluó la performance de este nuevo ELISA en el analizador automático «WL 2000 plus». Se compararon 362 muestras (positivas y negativas) utilizando la técnica manual y la técnica automatizada.

Conclusiones

El kit Chagatest ELISA recombinante v.4.0 presenta características de sensibilidad, especificidad y precisión adecuadas para ser utilizado tanto en el diagnóstico como en el tamizaje serológico de la infección por *T. cruzi*. También permite monitorear cada etapa operativa brindando una mayor seguridad en los resultados ya que sus reactivos son coloreados. Otra ventaja adicional es que este nuevo kit es fácilmente automatizable favoreciendo su utilización en los bancos de sangre.



ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES: MARCADORES EMERGENTES

Por más de 20 años las enfermedades cardiovasculares (ECV) han sido las principales causas de muerte y discapacidad en el mundo y se espera que esta situación se mantenga hasta el año 2020. A pesar de la reducción significativa en la mortalidad por ECV en los últimos 20 años, éstas continúan siendo uno de los principales motivos de muerte en USA superando las cifras de los distintos tipos de cáncer por más del 60%. Por este motivo, las prioridades de salud pública se centran en la prevención de los factores de riesgo: detección y tratamiento de los mismos, detección temprana y prevención de episodios cardiovasculares recurrentes. Esto hace imprescindible la búsqueda de biomarcadores con los que se logre una mejor detección del paciente en riesgo coronario, que pueda beneficiarse con la atención primaria preventiva.

Extraído de «National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Emerging Biomarkers of Cardiovascular Disease and Stroke, version 91906»

La American Heart Association (AHA) y el National Cholesterol Education Program a través de su panel de expertos (Adult treatment panel III - ATP III) han diseñado las recomendaciones de manera de identificar la mayor cantidad de personas asintomáticas y clínicamente libres de enfermedad cardíaca pero bajo suficiente riesgo como para desarrollar eventos coronarios futuros, de manera de justificar los esfuerzos en la reducción del riesgo. Dentro de estas recomendaciones se encuentran factores de riesgo específicos que incluyen el colesterol total, HDL y LDL colesterol, que se utilizan para predecir riesgo en algoritmos como el score de Framingham para estimar el riesgo global de contraer ECV. Sin embargo estos modelos predictivos tienen una exactitud menor a la deseada, lo que ha proporcionado un estímulo para buscar nuevos marcadores de riesgo. En los últimos años, se ha propuesto un gran número de analitos como factores de riesgo de ECV (Tabla). Se denominaron factores de riesgo emergentes debido a que están asociados con el riesgo de contraer ECV pero su contribu-

TABLA

• Proteína C reactiva	• Interleukinas
• Sustancia amiloide A	• Moléculas de adhesión celular y vascular
• Ligando soluble CD-40	• Recuento de leucocitos
• Fibrinógeno	• Inhibidor 1 de activador del plasminógeno
• Dímero D	• Activador del plasminógeno tisular
• Factores V, VII, VIII	• LDL pequeña
• Lipoproteína (a)	• Apolipoproteína A1 y B
• Subtipos LDL y HDL	• LDL oxidada
• Homocisteína	• Fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas
• Microalbuminuria	• Creatinina (velocidad de filtración glomerular)
• Cistatina C	• Agentes infecciosos
• Genotipo Apo E	• Fibrinopéptido A
• Lipoproteínas residuales	• Factor Von Willebrand

ción causal, independiente y cuantitativa a la ECV aún no está bien documentada como lo es la dislipidemia, hipertensión o el hábito de fumar.

Mientras que las recomendaciones del ATP III para el estudio del riesgo global utilizando los factores de riesgo tradicionales están basados en la fuerte evidencia apoyando su rol en la patogénesis de las ECV, el rol de los factores emergentes en la patogénesis de la enfermedad no está aún claro. Se ha debatido acerca de si los marcadores de riesgo deben estar relacionados con la enfermedad en forma causal o si su utilidad clínica puede ser igualmente considerada para un factor no causal pero que puede indicar un nuevo curso en la terapia que no sería tenida en cuenta de otro modo.

La National Academy for Clinical Biochemistry (NACB) ha formado un panel de expertos para desarrollar recomendaciones en cuanto al manejo de los datos relacionados con factores de riesgo propuestos. Los factores en estudio fueron seleccionados en base al consenso de los expertos en aspectos tales como consistencia de los datos epidemiológicos, mejora del valor predictivo, independencia de otros factores, método de análisis disponible. Entre estos analitos se encuentran la PCR ultrasensible (PCR-US) y el fibrinógeno.

Las recomendaciones emitidas por el panel de Expertos en relación con factores emergentes han sido desarrolladas en base a la evidencia publicada de su

uso en la prevención primaria de ECV en poblaciones supuestamente sanas comparándola con las recomendaciones del ATP III que se basan en la medida de colesterol, LDL colesterol y HDL colesterol. El primer paso en la predicción del riesgo primario es el cálculo del riesgo a 10 años basados en el Score de Riesgo Framingham u otra clasificación que incorpore el perfil lipídico (colesterol total, HDL-C, triglicéridos, LDL-C calculado y colesterol no-HDL)

Recomendación para marcadores de inflamación:

Se discutieron 24 analitos sustentados por estudios de observaciones. Fueron calificados por el Grupo de Trabajo en Inflamación de acuerdo a su practicidad para uso clínico, posibilidad de obtener la determinación en forma comercial y si los datos de las observaciones eran suficientes. De los analitos propuestos fueron seleccionados para el estudio, como más apropiados: la proteína C reactiva ultrasensible, fibrinógeno y recuento de glóbulos blancos.

A continuación se listan una serie de recomendaciones propuestas para estos marcadores emergentes para los cuales todavía queda mucho por estudiar. El borrador completo de las lista de recomendaciones con su discusión se puede encontrar en el sitio web de la AACC.

Resumen de recomendaciones

Desde el punto de vista clínico:

- Si el riesgo estimado a 10 años está en-

tre el 10 y el 20% y existe incertidumbre acerca del uso de terapia preventiva con estatinas o aspirina, la PCR-US puede ser de utilidad en la categorización posterior de riesgo mayor o menor.

- Basados en la experiencia actual, todavía son inciertos los beneficios obtenidos de la terapia preventiva en base a resultados de PCR-US. Todavía no existen datos suficientes.
- El monitoreo de PCR-US puede ser útil en la motivación de pacientes para mejorar sus hábitos de vida. Esta estrategia debe estudiarse.
- No existe evidencia que sustente la necesidad de medir concurrentemente otros marcadores de inflamación además de la PCR-US en el estudio del riesgo coronario.

Desde el punto de vista del laboratorio:

- De los marcadores de inflamación, la PCR-US es el analito que tiene las características más apropiadas.
- Utilizando PCR-US-
- Existe suficiente información para incluir al fibrinógeno como marcador independiente de riesgo cardiovascular.
- Todavía es insuficiente la estandarización del ensayo para uso del fibrinógeno como marcador de riesgo cardiovascular
- De acuerdo a los resultados de PCR-US estandarizados, los pacientes son categorizados en los siguientes niveles:
 - bajo < 1 mg/l
 - medio 1-3 mg/l
 - alto >3 mg/l
 - muy alto
- Las determinaciones de PCR deberán hacerse en pacientes metabólicamente estables y libres de infección o enfermedad aguda. Si el valor de PCR-US es mayor a 3 mg/l, conviene repetir la prueba dos semanas después para descartar condiciones de infección o inflamación aguda. Una vez repetido el ensayo se utiliza el menor de los valores. Si se obtienen valores mayores de 10 mg/l y se descartan procesos inflamatorios agudo u otras condiciones como neoplasias u obesidad, estaremos en presencia de un paciente de alto riesgo de ECV.

