

Capacidad discriminatoria y concordancia entre el ELISA-F29 y la PCR en individuos con infección por *T. cruzi*

Discriminatory Power and Concordance between ELISA-F29 and PCR in Individuals with Infection due to T.cruzi

Capacidade discriminatória e acordo entre o ELISA-F29 e a PCR em indivíduos infectados com T. cruzi

Edgar David Gómez-Laitón, MD.*

Laura Andrea Polo-Ardila, Enf.**

Yeny Zulay Castellanos-Domínguez, Bact., Esp., MSc***

Víctor Mauricio Herrera-Galindo, MD., MSc., PhD.****

Juan Carlos Villar-Centeno, MD., Esp., MSc., PhD. *****

Resumen

Introducción: El diagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) se realiza rutinariamente mediante pruebas serológicas mientras que el empleo de métodos moleculares se encuentra aún en proceso de estandarización. **Objetivo:** Evaluar la capacidad discriminatoria y concordancia entre una prueba serológica y una molecular para determinar la infección por *T. cruzi*. **Métodos:** Se realizó Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la prueba de ELISA-F29 en 95 muestras de participantes de la cohorte "Cardiovascular health investigation and collaboration countries of America to assess the markers and outcomes of Chagas disease" CHICAMOCHA. Se evaluó la capacidad discriminatoria del ELISA-F29 respecto al resultado de PCR mediante la estimación del área bajo la curva ROC. Se estimó la tasa de falsos positivos al 25% y sensibilidad al 75%. Se determinó la concordancia mediante kappa de Cohen. **Resultados:** Se realizaron pruebas de PCR en dos momentos diferentes en

95 individuos (edad media: 38 años; 64% hombres), con tasas de positividad entre 1.1% – 2.2% para los primers S35-S36 y entre 18.3% – 34.7% para los primers 121-122, respectivamente. La capacidad discriminatoria del ELISA-F29 respecto a PCR fue 0.62 (IC95%: 0.53; 0.70) y tasa de falsos positivos del 56% (IC95%: 42; 70). El punto de corte óptimo para el cociente de absorbancia fue 2.53 (sensibilidad 59% y especificidad 60%). Para el primer 121-122 los niveles de acuerdo observado y kappas estimados fueron: 52.6% y 0.10 (IC95%: -0.08, 0.28) para la primera medición, 62.4% y 0.09 (IC95%: -0.09, 0.28) para la segunda medición y 57.5% y 0.13 (IC95%: 0.01, 0.26) al evaluar simultáneamente las dos mediciones. **Conclusiones:** Los resultados demuestran una baja concordancia evidenciada por los valores de kappa determinados en el estudio. Es necesario afinar los estudios para evaluar la utilidad de las pruebas moleculares en el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. [Gómez-Laitón ED, Polo-Ardila LA, Castellanos-Domínguez YZ, Herrera VM, Villar JC. Capacidad discriminatoria y concordancia entre el ELISA-F29 y la PCR en individuos con infección por *T. cruzi*. MedUNAB 2015; 18 (1): 27-33].

* Médico General, Fundación Oftalmológica de Santander-FOSCAL.

** Enfermera, Hospital Universitario de Bucaramanga Los Comuneros.

*** Bacterióloga y Laboratorista Clínico, Especialista en Auditoría de Servicios de Salud, Magister en Epidemiología; Facultad de Ciencias de la Salud, Grupo de Cardiología Preventiva. Universidad Autónoma de Bucaramanga.

**** Médico, Magister y Doctor en Epidemiología; Facultad de Ciencias de la Salud, Grupo de Cardiología Preventiva, Universidad Autónoma de Bucaramanga.

***** Médico, Especialista en Medicina Interna, Magister y Doctor en epidemiología Clínica, Facultad de Ciencias de la Salud, Grupo de Cardiología Preventiva, Universidad Autónoma de Bucaramanga.

Correspondencia: Juan Carlos Villar Centeno, Calle 157 No. 14-55, Floridablanca, Colombia. Universidad Autónoma de Bucaramanga, Teléfono 6436111 extensión 516. Email: jcvillar@unab.edu.co

Artículo recibido: 16 de marzo de 2015

Aceptado: 25 de julio de 2015

Palabras Clave: Reacción en Cadena de la Polimerasa; Enfermedad de Chagas; *Trypanosoma cruzi*; Diagnóstico; Serología.

Abstract

Introduction: The diagnosis of infection with *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) is routinely performed by serological tests while the use of molecular methods is still in process of standardization. **Objective:** To evaluate the discriminatory capacity and agreement between a serological test and a polymerase chain reaction (PCR) to determine *T. cruzi* infection. **Methodology:** PCR and ELISA test-F29 were performed to 95 participants of "Cardiovascular health investigation and collaboration countries of America to assess the markers and outcomes of Chagas disease" (CHICAMOCHA). Discriminatory capacity of ELISA -F29 with respect to PCR results were evaluated by estimating the area of ROC curve. The false positive rate was estimated to 25% and sensitivity to 75%. The agreement was determined using Cohen's kappa. **Results:** PCR tests were performed at two different times in 95 individuals (mean age: 38; 64% male), with positivity rates between 1.1 to 2.2% for S35-S36 primers and from 18.3% to 34, 7% for primers 121-122, respectively. ELISA-F29 discriminatory capacity regarding PCR was 0.62 (95% CI: 0.53, 0.70). The false positive rate was 56% (95% CI: 42; 70). The optimal cutoff for absorbance ratio of ELISA-F29 was 2.53 (sensitivity 59%, specificity 60%). For the primers 121-122, levels of observed agreement and kappa estimates were 52.6% and 0.10 (95% CI: -0.08, 0.28) for the first measurement, 62.4% and 0.09 (95% CI: -0.09, 0.28) for the second measurement, and 57.5% and 0.13 (95% CI: 0.01, 0.26) for the two measurements simultaneously evaluated. **Conclusions:** The results show poor agreement evidenced by kappa values determined in the study. It is necessary to refine the studies to evaluate the utility of molecular testing in the diagnosis of Chagas disease. [Gómez-Laitón ED, Polo-Ardila LA, Castellanos-Domínguez YZ, Herrera VM, Villar JC. Discriminatory power and concordance between ELISA-F29 and PCR in individuals with infection due to *T.cruzi*. MedUNAB 2015; 18 (1): 27-33].

Keywords: Polymerase Chain Reaction; Chagas Disease; *Trypanosoma cruzi*; Diagnosis; Serology.

Introducción

La enfermedad de Chagas, causada por el parásito tisular *Trypanosoma cruzi*, representa un evento de vigilancia de salud pública en los países de América Latina. Aunque se ha reportado que la carga de la enfermedad ha disminuido entre 1990 y 2001 a una cuarta parte, se estima que aparecen cerca de 50,000 casos nuevos al año en las zonas endémicas. Asimismo, se ha documentado que cerca del 30% de los infectados pueden desarrollar enfermedad crónica con riesgo de presentar complicaciones cardíacas y/o digestivas(1,2).

Para el diagnóstico de la infección en las etapas asintomática y crónica en la actualidad se dispone de

Resumo

Introdução: O diagnóstico de infecção por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) é rotineiramente realizado por sorologia, enquanto o uso de métodos moleculares ainda está sendo padronizado. **Objetivo:** Avaliar a capacidade discriminatória e a concordância entre um teste sorológico e o molecular para determinar a infecção pelo *T. cruzi*. **Metodologia:** Foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a prova de ELISA-F29 em 95 amostras de participantes da coorte "Investigação em Saúde Cardiovascular e colaboração com os países da América para avaliar os marcadores e resultados de doença de Chagas" CHICAMOCHA. Foi avaliada a capacidade discriminatória do ELISA-F29 com relação aos resultados de PCR por meio da avaliação da área com a curva de ROC. A taxa de falsos positivos é estimada em 25% e a de sensibilidade em 75%. A correlação é determinada por Cohen kappa. **Resultados:** Foram realizados testes de PCR em dois momentos diferentes, em 95 indivíduos (idade média: 38 anos; 64% do sexo masculino), com taxas de positividade entre 1,1% - 2,2% para os primeiros S35-S36 e entre 18,3% - 34,7% para os primeiros 121-122, respectivamente. O poder discriminatório ELISA-F29 sobre PCR foi 0,62 (IC 95%: 0,53; 0,70) e taxa de falsos positivos de 56% (IC 95%: 42; 70). O ponto de corte ótimo para a relação de absorvância foi de 2,53 (59% de sensibilidade, especificidade de 60%). Para os primeiros 121-122, de acordo com os níveis observados e kappas estimadas foram 52,6% e 0,10 (IC95%: -0,08, 0,28) para a primeira medição, 62,4% e 0,09 (IC 95%: -0,09, 0,28) para a segunda medição, 57,5% e 0,13 (IC95%: 0,01, 0,26) ao avaliar simultaneamente as duas medições. **Conclusões:** Os resultados mostram pouca concordância evidenciada pelos valores de kappa determinados no estudo. É necessário precisar e ajustar os estudos para avaliar a utilidade do teste molecular no diagnóstico da doença de Chagas. [Gómez-Laitón ED, Polo-Ardila LA, Castellanos-Domínguez YZ, Herrera VM, Villar JC. Capacidade discriminatória e acordo entre o ELISA-F29 e a PCR em indivíduos infectados com *T. cruzi*. MedUNAB 2015; 18 (1): 27-33].

Palavras-chave: Reação em Cadeia da Polimerase; Doença de Chagas; *Trypanosoma cruzi*; Diagnóstico; Sorologia.

pruebas serológicas y moleculares. Mientras las primeras son pruebas indirectas y se basan en la detección de anticuerpos generados contra el parásito, el diagnóstico molecular se fundamenta en la detección directa del ADN del parásito y no depende del estado inmunológico del paciente ni del tiempo de adquisición de la infección(3,4).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), mediante el empleo de los primers S35-S36, ha permitido la detección de *T. cruzi* en tejidos infectados con cepas I y II del parásito y ha sido utilizada para monitorear pacientes con cardiomiopatía chagásica. Por su parte el ELISA-F29, que emplea una proteína ligadora de calcio del *T. cruzi*, ha sido utilizado como marcador temprano de reversión de la infección con Chagas (5,6).

El objetivo del estudio fue evaluar la capacidad discriminatoria y la concordancia de los niveles de anticuerpos contra el antígeno F29 con relación a la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en individuos con diagnóstico serológico convencional confirmado para infección por *T. cruzi*.

Metodología

Población y muestra

De una cohorte prospectiva de donantes de bancos de sangre del área metropolitana de Bucaramanga reclutados entre los años 2000-2003, los cuales hacen parte del estudio *Cardiovascular Health Investigation and Collaboration to Assess the Markers and Outcomes of Chagas disease (CHICAMOCHA)*, se evaluó una muestra de 95 individuos con diagnóstico serológico convencional confirmado para infección por *T. Cruzii*. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética en Investigaciones de la Universidad Autónoma de Bucaramanga (UNAB) donde los participantes firmaron consentimiento informado, de acuerdo con lo establecido en la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia.

Procedimientos

Se definió diagnóstico serológico convencional confirmado, al resultado consistentemente positivo de mínimo 2 de 3 pruebas (ELISA, Inmunofluorescencia Indirecta [IFI] y Hemoaglutinación Indirecta [HAI]), en aquellos donantes que tuvieron un tamizaje positivo en bancos de sangre.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

En el laboratorio de Genética de la UNAB, se realizó la estandarización de la (PCR) en sangre periférica. La muestra se mezcló con 7 ml de clorhidrato de guanidina y EDTA a temperatura ambiente por inversión durante 15 minutos. Posteriormente se hizo almacenamiento temporal en posición vertical por 8 días a temperatura ambiente, seguido de almacenamiento definitivo a 4°C. Se realizó extracción de ADN con el Kit QIAamp DNA Blood Midi de Qiagen®: La muestra fue precalentada durante 15 minutos a 100°C, tomando 2 ml que se mezclaron con proteinasa K y buffer de lisis. El buffer de lisis se ajustó para permitir fijar el ADN a la membrana. El ADN se absorbió por la membrana de sílica gel durante la centrifugación. Las condiciones de pH en el lisado aseguraron que las proteínas y otros contaminantes que pudiesen inhibir la PCR y otras reacciones enzimáticas, no fueran retenidos en la membrana. Se procedió a realizar lavados con el fin de eliminar contaminantes.

Con el fin de verificar si el proceso de extracción de ADN se efectuó adecuadamente, se realizó una PCR empleando una pareja de cebadores que amplificaron un fragmento del gen de la b-actina. Este fragmento sirvió como control interno de la reacción de amplificación, dado que debía amplificar en todas las muestras que contuvieran DNA genómico humano. Para la identificación de *T. cruzi*, se escogieron tres grupos de primers. Para los tres juegos de primers, se realizaron cuatro variaciones en las condiciones de la master Mix, con el fin de estandarizar la técnica. Para los montajes se emplearon siete muestras y un control negativo (agua grado molecular). Todos los ensayos presentaron amplificación en el control positivo y los controles negativos sin amplificación, lo cual validó cada montaje. De esta forma se estableció un protocolo de extracción y de master Mix. Los primers finalmente escogidos para el estudio fueron S35 (5'- AAA TAA TGT ACG GKG GAG ATG CAT GA -3') -S36 (5'- GGG TTC TGG GGT TGG TGT -3') y 121(5'- AAA TAA TGT ACG GGT GAG ATG CAT GA -3') -122 (5'- GGT TCG ATT GGG GTT GGT GTA ATA TA -3'), que se emplearon para evaluar a los participantes en dos momentos con un intervalo de aproximadamente un año.

Ensayo Enzimático Ligado a una Enzima (ELISA)

Se realizó una prueba de ELISA con antígeno F29 paralelamente a la evaluación de PCR. El antígeno F29 correspondió a una proteína flagelar, ligadora de calcio de *T. cruzi*. Brevemente, microplacas de poliestireno de 96 pozos fueron revestidas con el antígeno recombinante y posteriormente las muestras de suero fueron incubadas a 37°C para que se generara la reacción antígeno-anticuerpo. Tras la adición de conjugado anti-inmunoglobulina G humana, la actividad enzimática fue detectada por la adición del sustrato cromogénico p-nitrofenilfosfato. Para cada participante fue calculado el cociente entre la densidad óptica de su muestra y la densidad óptica del control negativo. Una prueba ELISA-F29 positiva fue determinada cuando el cociente de densidades ópticas fue mayor o igual al percentil 95, tomando como referencia la distribución de los valores de la prueba en participantes seronegativos de la cohorte.

Análisis estadístico

Se describen las variables continuas empleando medias (desviación estándar) y las discretas mediante conteos (proporciones). Se evaluaron las diferencias del cociente de densidades ópticas para ELISA-F29, de acuerdo a los resultados de PCR para cada par de primers, empleando la prueba *t* de *student*. Fue determinada la capacidad discriminatoria para dicho cociente con respecto al resultado de PCR mediante la estimación no paramétrica del área bajo la curva ROC (AUC). Adicionalmente, se estimó la sensibilidad y la especificidad esperadas fijando la tasa de falsos positivos al 25% y la sensibilidad al 75%,

respectivamente. Finalmente, se determinó la concordancia de los resultados dicotomizados de la prueba ELISA-F29 y el resultado de PCR mediante la estimación de la kappa de Cohen. Para todos los estimados se presentaron sus respectivos intervalos de confianza del 95% (IC95%).

Resultados

Se realizaron pruebas de PCR en 2 ocasiones diferentes en 95 individuos (edad media: 38 años; 64% hombres), con

tasas de positividad entre 1.1 - 2.2% para los primers S35-S36 y entre 18.3 - 34.7% para los primers 121-122, respectivamente (Tabla 1). No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los cocientes de densidad óptica para los niveles de anticuerpos para el ELISA-F29 al comparar individuos con PCR [+] y PCR [-] para los primers S35-S36. Por otra parte, observamos mayores niveles de anticuerpos entre los individuos con PCR [+] para los primers 121-122, comparados con aquellos con PCR [-], aunque solo cuando fueron consideradas las dos determinaciones conjuntamente (Figura 1): Diferencia media entre los cocientes de densidad óptica de 0.6 unidades (IC95%: 0,1; 1,0).

Tabla 1. Media del cociente de densidad óptica (muestra/control negativo) de la prueba ELISA para F29, de acuerdo al resultado de la prueba de PCR para los primers S35 y 121 en participantes con diagnóstico serológico confirmatorio para *T. cruzi*.

Primer	Medición Orden (n[-]/n[+])	Resultado		Δ (IC95%)
		[-]	[+]	
S35	1 (93/2)	2.8 (1.5)	3.5 (2.7)	0.7 (-1.5, 2.8)
	2 (92/1)	2.1 (0.9)	4.0 (...)	...
	Todos* (185/3)	2.5 (1.3)	3.7 (1.9)	1.2 (-0.3, 2.7)
121	1 (62/33)	2.7 (1.5)	3.1 (1.6)	0.4 (-0.3, 1.0)
	2 (76/17)	2.0 (0.9)	2.5 (1.5)	0.5 (-0.1, 1.0)
	Todos* (138/50)	2.3 (1.2)	2.9 (1.5)	0.6 (0.1, 1.0)

* Diferencia e IC95% corregidos por correlación de las mediciones (2 por cada individuo).

Δ Diferencia media entre muestras positivas y negativas, corregida por correlación de mediciones
...No estimable

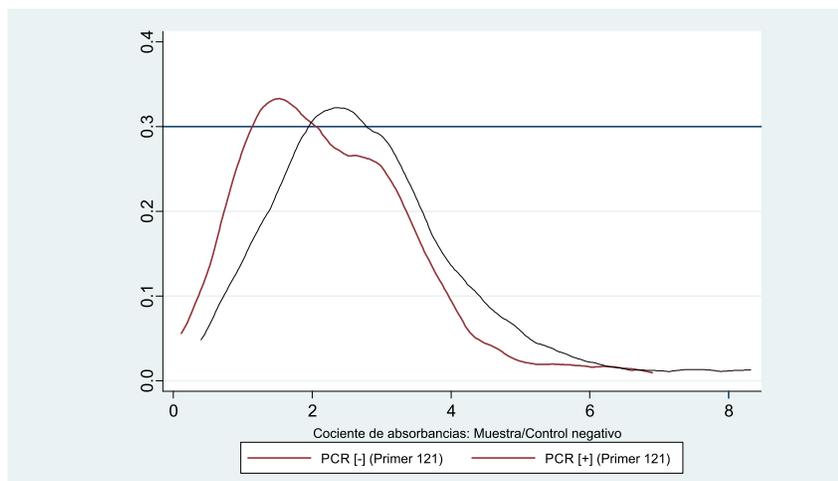


Figura 1. Distribución de valores del cociente de densidad óptica (muestra/control negativo) de la prueba ELISA para F29, de acuerdo a los resultados de las pruebas de PCR para el primer 121 en participantes con diagnóstico serológico confirmatorio para *T. cruzi*.

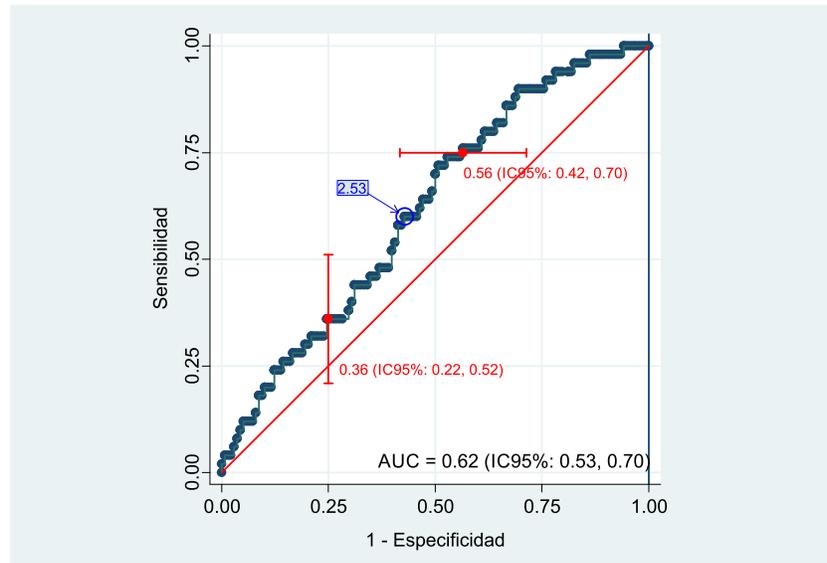


Figura 2. Capacidad discriminativa* del cociente de densidad óptica (muestra/control negativo) de la prueba ELISA para F29, con relación al resultado de la prueba de PCR para el primer 121 en participantes con diagnóstico serológico confirmatorio para *T. cruzi*.

* Sensibilidad, especificidad, AUC e IC95% corregidos por correlación de las mediciones (entre 2-3 por cada individuo). En rojo se presenta la sensibilidad media e IC95% (línea vertical) y la tasa de falsos positivos (1 – especificidad) media e IC95% (línea horizontal) al fijar la especificidad y la sensibilidad en 0.75, respectivamente. Dentro del círculo azul se encuentra el punto de corte del cociente de absorbancia (2.53) que maximiza simultáneamente la sensibilidad y especificidad de la prueba: 0.59 y 0.60, respectivamente.

La capacidad discriminativa de los niveles de anticuerpos para ELISA-F29, con relación a la prueba de PCR, solo pudo ser evaluada para la pareja de primers 121-122 (Figura 2). En este caso, el AUC estimada fue de 0.62 (IC95%: 0.53; 0.70). Fijando la sensibilidad del nivel de anticuerpos al 75%, la tasa de falsos positivos fue del 56% (IC95%: 42% - 70%), es decir, una especificidad del 44%. Por otra parte, fijando la tasa de falsos positivos al 25% (especificidad del 75%), la sensibilidad estimada fue del 36% (IC95%: 22%-52%). Con base en la misma curva ROC, se determinó que 2.53 es el punto de corte óptimo para el cociente de absorbancia, en cuanto este maximiza simultáneamente la sensibilidad y la especificidad (59% y 60%, respectivamente).

En términos de concordancia de los resultados de la prueba ELISA-F29 (dicotomizada) y de la PCR, para el caso de los primers S35-S36 los niveles de acuerdo observado y kappas estimados fueron: 41.1% y -0.01 (IC95%: -0.06; 0.04) para la primera medición, 64.5% y 0.04 (IC95%: -0.02; 0.09) para la segunda medición y 52.7% y 0.01 (IC95%: -0.03; 0.05) cuando se consideraron conjuntamente las dos mediciones. En cuanto al par de primers 121-122 los niveles de acuerdo observado y kappas estimados fueron: 52.6% y 0.10 (IC95%: -0.08; 0.28) para la primera medición, 62.4% y 0.09 (IC95%: -0.09; 0.28) para la segunda medición y 57.5% y 0.13 (IC95%: 0.01; 0.26) al evaluar simultáneamente las dos mediciones.

Discusión

Este estudio evaluó el desempeño de la prueba de ELISA-F29 frente a la PCR validada en nuestro laboratorio usando los primers S35-S36 y 121-122, en términos de su capacidad discriminativa y nivel de acuerdo en individuos asintomáticos con diagnóstico serológico convencional confirmado para infección por *T. cruzi*. Los resultados permiten documentar que se encontró una tasa de positividad de la prueba de PCR inferiores al 5% al emplear el par de primers S35-S36, mientras que estas oscilaron entre 18 – 35% para los primers 121-122.

La PCR es una prueba molecular incluida para respaldar el diagnóstico de infección con *T. cruzi* desde finales de los ochenta (7). Su capacidad diagnóstica en términos de sensibilidad y especificidad depende de factores muy variables como son el volumen y conservación de la muestra, la técnica de extracción del ADN, el protocolo de la prueba de PCR que incluye los primers seleccionados junto con las condiciones de termociclaje y la presencia de inhibidores que interfieren en la amplificación del material genético (8). Por su parte, el parásito tiene una circulación intermitente en el torrente sanguíneo del paciente infectado lo que interfiere con la sensibilidad de la prueba, a su vez se ha documentado la existencia de 6 unidades de tipificación diferentes [DTUs] por lo que es frecuente encontrar polimorfismos dentro de la

secuencia del fragmento genético que no permite la amplificación del ADN del *T. cruzi* (9).

El empleo de los primers S35-S36 y 121-122 garantiza la amplificación de un fragmento de 330 pb de la región variable de los minicírculos de *T. cruzi*. En nuestro estudio, la pareja de primers 121-122 presentó mejores resultados de amplificación frente al S35-S36. Contrario a estos resultados, la técnica con el primer S35-S36 ha sido utilizada con éxito en el país para monitorear pacientes con cardiomiopatía chagásica e identificar reactivación de la infección. Estos resultados pueden deberse a la versatilidad del parásito, dada por los DTUs y a las características de amplificación inherentes a cada uno de los primers utilizados en cada una de las pruebas (6,9,10).

Tradicionalmente las pruebas serológicas han sido utilizadas como gold estándar para el diagnóstico de la infección con *T. cruzi* en especial la prueba de ELISA (11,12). No obstante, la revisión exhaustiva de estudios prospectivos para evaluar la calidad diagnóstica de esta técnica, han dado muestra de que sus características de sensibilidad y la especificidad para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas son menos precisos de lo que se ha documentado hasta la fecha, sin embargo, hoy en día se siguen utilizando para la clasificación del estado de infección de los pacientes (13). Para aumentar la especificidad del ELISA, se han diseñado antígenos recombinantes, para el caso de este estudio se utilizó el antígeno recombinante F29 que emplea una proteína ligadora de calcio del *T. cruzi*; esta técnica ha sido utilizada para medir la eficacia terapéutica del tratamiento de la infección con Chagas (14).

Para efectos de este estudio, se evaluó la concordancia entre los niveles de anticuerpos para antígeno recombinante F29 y la PCR (S35-S36 y 121-122). Los resultados demuestran una baja concordancia evidenciada por los valores de kappa presentados. Resultados similares han sido documentados en estudios que han empleado los mismos juegos de primers que se usaron en esta investigación y otros como el TZC1-TCZ2, obteniéndose índices kappa por debajo de 0.5 (15-18).

Investigaciones realizadas en los últimos cinco años para evaluar la capacidad diagnóstica del ELISA vs PCR en infección crónica no recomiendan el empleo de la PCR para el diagnóstico en la práctica clínica dadas las limitaciones de esta ya que en la actualidad no se dispone de reportes técnicos estandarizados que den muestra de las cualidades de esta prueba, por lo que se han sugerido estudios para validar la técnica de PCR (19). Revisiones de literatura realizadas para evaluar el rendimiento de la PCR para diagnóstico de Chagas en fase crónica, documentan que la sensibilidad de esta técnica oscila entre 50-90% (19,20).

Dentro de las fortalezas del estudio se destaca el seguimiento realizado a la cohorte de pacientes para hacer

las mediciones sanguíneas en dos momentos distintos con intervalo promedio de un año. Una de las limitaciones fue la ausencia de cuantificación del número de copias del ADN, por lo anterior, se sugiere que para estudios futuros se realice PCR en tiempo real.

Conclusiones

Se observó una positividad menor al 50% para la PCR usando los primers S35-36 y 121-122, en pacientes con diagnóstico de infección por *T. cruzi*. Estos resultados demuestran una baja concordancia entre la PCR y ELISA-F29 evidenciada por los valores de kappa determinados en el estudio.

Conflicto de intereses

Los autores manifiestan que no tienen ningún conflicto de interés.

Financiación

El presente estudio fue financiado con fondos de Colciencias, el Programa Jóvenes Investigadores e Innovadores “Virginia Gutiérrez de Pineda” y la Universidad Autónoma de Bucaramanga UNAB.

Referencias

1. World Health Organization. Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. World Heal Organ Tech Rep Ser. 2012;975(v-xii):1-100.
2. Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. Trends Parasitol. 2006 Dec;22(12):583-8.
3. 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.
4. 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.
5. Pavia PX, Roa NL, Uribe AM PC. Using S35-S36 and TcH2AF-R primer-based PCR tests to follow-up a Chagas' disease patient who had undergone a heart transplant. Biomédica. 2011;31(2):178-84.
6. Barrera YK, Guevara JM, Pavia PX, Montilla M, Nicholls RS, Parra E, Puerta C. Evaluation of TcH2AF-R and S35-S36 primers in PCR tests for the detection of *Trypanosoma cruzi* in mouse cardiac tissue. Biomédica. 2008;28(4):616-26.
7. Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA Amplification Using the

- Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol.* 1989;27(7):1477–82.
8. Duffy T, Bisio M, Altcheh J, Burgos JM, Diez M, Levin MJ, et al. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3(4).
 9. Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejia 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).
 10. Pavía PX, Roa NL, Uribe AM, Puerta Bula CJ. [Using S35-S36 and TcH2AF-R primer-based PCR tests to follow-up a Chagas' disease patient who had undergone a heart transplant]. *Biomédica Rev del Inst Nac Salud [revista en internet].* 2011;31(2):178–84. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22159533>
 11. Cannova D, Aguilar M, Pacheco M, Simons 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.
 12. Da Silveira J, Umezawa E, Luguetti AO. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *TRENDS Parasitol.* 2001;17(6):286–91.
 13. Afonso AM, Ebell MH, Tarleton RL. A Systematic Review of High Quality Diagnostic Tests for Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(11).
 14. Fabbro D, Velázquez E, Biza L, Denner S, Oliveira V et al. Evaluation of the ELISA-F29 test as an early marker of therapeutic efficacy in adults with chronic Chagas disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2013;55(3):167–72.
 15. Bianchi F, Cucunubá Z, Guhl F, González NL, Freilij H, Nicholls RS, et al. Follow-up of an Asymptomatic Chagas Disease Population of Children after Treatment with Nifurtimox (Lampit) in a Sylvatic Endemic Transmission Area of Colombia. *PLoS, Neglected Trop Dis [revista en internet].* 2015;10(2):e0003465. Disponible en: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003465>
 16. Gilbet SR, Alban SM, Gobor L, De Oliveira Bescrovaine J, Myiazaki MI, Thomaz-Soccol V. Comparison of conventional serology and PCR methods for the routine diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013;46(April):310–5.
 17. Ramírez JD, Guhl F, Umezawa ES, Morillo CA, Rosas F, Marín-Neto JA, et al. Evaluation of adult chronic Chagas' heart disease diagnosis by molecular and serological methods. *J Clin Microbiol [revista en internet].* 2009;47(12):3945–51. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2786654&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 18. Duarte LF, Flórez O, Rincón G, González CI. Comparison of seven diagnostic tests to detect *Trypanosoma cruzi* infection in patients in chronic phase of Chagas disease. *Colombia Médica.* 2014;2014:61–6.
 19. Brasil PE a a, De Castro L, Hasslocher-Moreno AM, Sangeris LHC, Braga JU. ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis [revista en internet]. BioMed Central Ltd;* 2010;10(1):337. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/10/337>
 20. De Winne K, Büscher P, Luquetti AO, Tavares SBN, Oliveira R a., Solari A, et al. The *Trypanosoma cruzi* Satellite DNA OligoC-Test and *Trypanosoma cruzi* Kinetoplast DNA OligoC-Test for Diagnosis of Chagas Disease: A Multi-cohort Comparative Evaluation Study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(1):55.