



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**TÍTULO:**

**DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO DE LAS  
TRIPANOSOMOSIS**

Autor: Lourdes Cañadas Fernández.

Tutor: Alicia Gómez Barrio.

Convocatoria: Febrero 2017.

## RESUMEN

La tripanosomosis americana o enfermedad de Chagas es causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. En la fase aguda, debido a la alta carga parasitaria en sangre, el diagnóstico es parasitológico directo. En la fase crónica, debido a la disminución de la carga parasitaria, se necesitan técnicas de diagnóstico inmunológico indirectas. La tripanosomosis africana o enfermedad del sueño está causada por dos subespecies de *Trypanosoma*: *Trypanosoma brucei gambiense* y *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Se caracteriza por presentar glicoproteínas de alta variabilidad (VSG) que protegen al parásito de nuestro sistema inmunitario.

En el presente trabajo se describirán las diferentes técnicas de diagnóstico inmunológico de las tripanosomosis americana y africana disponibles en la actualidad. Se procederá, para ello, a la revisión de la literatura científica en los últimos 10 años.

En la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas: Hasta el momento no disponemos de una técnica de referencia para el diagnóstico inmunológico. Según la OMS, se precisan dos test con resultados positivos. Disponemos de técnicas de diagnóstico inmunológico con alta sensibilidad y especificidad, tradicionales (ELISA, IFI, HAI) y de nueva generación (CMIA). Determinados test rápidos se ofrecen como alternativa a los anteriores, especialmente útiles en áreas con pocos recursos. En caso de discrepancia de los anteriores, se recomienda un tercer test confirmatorio como el western-blot. En la tripanosomiasis africana o enfermedad del sueño: La evidencia es más limitada que en la enfermedad anterior. El diagnóstico serológico de la enfermedad del sueño requiere técnicas que empleen múltiples antígenos, que excluyan la obtención de falsos negativos. Además, también existen pruebas rápidas útiles en el cribado de la enfermedad pero por sus variables valores de sensibilidad y especificidad, no deben de emplearse como técnicas para realizar un diagnóstico definitivo.

**PALABRAS CLAVE:** *T. cruzi*, *T. brucei*, diagnóstico, técnicas inmunológicas.

## ABSTRACT

American trypanosomosis or Chagas disease is caused by the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*. In the acute phase, due to the high parasitic blood load, the diagnosis is direct parasitological. In the chronic phase, due to the decrease in the parasite load, in direct immunological diagnostic techniques are needed. African trypanosomosis or sleep disease is caused by two subspecies of *Trypanosoma*: *Trypanosoma brucei gambiense* and *Trypanosoma brucei rhodesiense*. It is characterized by high glycoproteins (VSG) that protect the parasite from our immune system.

In the present work the different techniques of immunological diagnosis of the American and African trypanosomosis available today will be described. To this end, a review of the scientific literature will be carried out in the last 10 years.

In American tripanosomiasis or Chagas disease: To date, we do not have a reference technique for immunological diagnosis. According to the WHO, two tests with positive results are needed. We have techniques of immunological diagnosis with high sensitivity and specificity, traditional (ELISA, IFI, HAI) and new generation (CMIA). Certain rapid tests are offered as an alternative to the above, especially useful in areas with few resources. In case of discrepancy of the previous ones, a third confirmatory test like western-blot is recommended. In African tripanosomiasis or sleeping sickness: The evidence is more limited than in the previous disease. The serological diagnosis of sleep disease requires techniques that employ multiple antigens, which exclude the obtaining of false negatives. In addition, there are also rapid tests useful in the screening of the disease, but because of their variable values of sensitivity and specificity, they should not be used as techniques for a definitive diagnosis.

**KEY WORDS:** *T. cruzi*, *T. brucei*, diagnosis, immunological techniques.

## INTRODUCCIÓN

*Trypanosoma* es un protozoo perteneciente a la Familia Trypanosomatidae. Se caracteriza por ser un protozoo hemoflagelado causante de las dos tripanosomosis más importantes en el mundo. Ambas son zoonosis, que cursan con un ciclo vital complejo en el que el participa el ser humano como hospedador vertebrado<sup>1</sup>.

El diagnóstico inmunológico se basa en la detección de anticuerpos IgG o IgM anti-*T.cruzi* anti-*T.brucei*. En la fase crónica de las tripanosomosis la parasitemia disminuye notablemente, por lo que será en esta fase donde este tipo de diagnóstico será más efectivo. Las técnicas inmunológicas utilizan como antígenos tanto el parásito completo o extractos purificados, antígenos recombinantes o péptidos sintéticos<sup>2</sup>. El concepto básico que debe tenerse en cuenta es que lo que se busca no es el parásito y, por lo tanto, sus resultados nunca proporcionan certeza diagnóstica y deben medirse en términos de probabilidad<sup>3</sup>.

Para que las probabilidades de éxito en el diagnóstico inmunológico se acerquen a la certeza es imprescindible seleccionar adecuadamente el método a emplear, el momento de la toma de muestra y, asimismo, interpretar adecuadamente los resultados. Estos se expresan como Positivos o Negativos (todo o nada), lo cual merece una interpretación diferente. Por otro lado, los informes no se expresan en unidades concretas sino relativas (“título”) y, asimismo, se establece un valor de corte arbitrario que puede no ser el mismo para distintas regiones geográficas, por la presencia en alguna de ellas de otros parásitos que puedan interferir en el diagnóstico, dando “reacciones cruzadas”<sup>3</sup>.

Existen dos tipos de tripanosomosis humanas que son causadas por distinta especie de *Trypanosoma*: Tripanosomosis americana o enfermedad de Chagas causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) y la Tripanosomosis africana o enfermedad del sueño causada por dos subespecies de *Trypanosoma*. *Trypanosoma brucei gambiense* y *Trypanosoma brucei rhodesiense*<sup>1</sup>.

### **Tripanosomosis americana o Enfermedad de Chagas.**

La enfermedad de Chagas comprende una fase aguda, seguida de una fase crónica, con una parasitemia escasa y una clínica que va desde la ausencia de síntomas hasta una cardiopatía severa. El parásito es transmitido por un vector hematófago (triatomino) cuando defeca sobre la picadura que el mismo ha realizado para alimentarse. También es transmitida

por la ingesta de alimentos contaminados, a través de transfusión de hemoderivados, de trasplante de tejidos no controlados así como de madres a hijos<sup>4</sup>.

Esta enfermedad de Chagas es endémica en América Latina y se estima que existan aproximadamente entre 7 y 8 millones de personas infectadas y 25 millones de personas se encuentran en riesgo de padecer la enfermedad. Los constantes flujos migratorios han favorecido la presencia de pacientes con esta enfermedad en todos los continentes. Este hecho ha llevado a que los profesionales sanitarios se actualicen para poder dar respuesta a tal demanda asistencial<sup>5</sup>. En zonas no endémicas, como es el caso de España, se estima por la gran afluencia de inmigrantes de los países donde esta enfermedad es endémica. En nuestro entorno se estima que hay 42.000 adultos y se espera que unas 17.000 personas van a requerir de atención médica por cardiopatía chagásica. Las principales vías de transmisión en países no endémicos son la sanguínea y la congénita. A nivel general en Europa no hay una legislación para la prevención de la transmisión de *T. cruzi* a través de las donaciones de sangre, sólo hay normas o directivas al respecto. Otra dificultad radica en que la percepción del riesgo por parte de las comunidades afectadas es muy baja, a lo que se suma que no todos los centros sanitarios ofrecen programas de cribado y que muchos de los profesionales de la salud no tienen experiencia en el diagnóstico y manejo de pacientes con Chagas<sup>6</sup>.

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas depende en gran medida de la fase de la enfermedad en que se encuentre el paciente:

En la fase aguda, que perdura hasta unas 6 semanas después de la infección, los pacientes muestran síntomas inespecíficos, como fiebre o dolores de cabeza. En esta fase la parasitemia es elevada por lo que se podría detectar el parásito mediante métodos directos en sangre periférica. La microscopía directa de sangre periférica en fresco permite visualizar al tripomastigote (forma infectante del parásito) en movimiento. También es posible realizar diferentes tinciones (Giemsa) sobre extensión periférica o gota gruesa de sangre periférica. La sensibilidad se puede incrementar mediante técnicas de concentración como son el microhematocrito o el método de Strout. La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR es un método de diagnóstico molecular que detecta el ADN del parásito que se encuentra en la sangre de los pacientes. En general, es una técnica más sensible que la microscopía, ya que puede detectar pequeñas cantidades de ADN de *T. cruzi* en la sangre. Sin embargo, su implementación requiere de un laboratorio especializado<sup>5</sup>. En nuestro

entorno, la PCR se utiliza cada vez más para el diagnóstico precoz de la enfermedad de Chagas congénita<sup>7</sup>.

En la fase crónica, que puede durar hasta 30 años, la mayoría de pacientes se muestran asintomáticos. Aproximadamente uno de cada tres pacientes desarrolla complicaciones cardíacas (insuficiencia cardíaca, arritmias) y uno de cada diez, complicaciones digestivas, neurológicas o mixtas. En esta fase la parasitemia suele ser baja o indetectable, y la sensibilidad no supera el 60% incluso empleando técnicas de PCR. Por ello, el diagnóstico es indirecto mediante métodos inmunológicos o serológicos<sup>7</sup>.

### **Tripanosomosis africana o Enfermedad del Sueño.**

La enfermedad del sueño, se transmite mediante la picadura de la mosca tsetse perteneciente al género *Glossina*. Esta mosca se encuentra en el África subsahariana pero sólo algunas especies transmiten la enfermedad. Los tripanosomas forman parte del grupo *salivaria* debido a la modalidad de transmisión por la picadura del vector. La infección por picadura se denomina inoculante<sup>6</sup>. Es una enfermedad con inicio agudo y velocidad de progresión más rápida. Se desarrolla en tres fases: chancro de inoculación, enfermedad aguda (fiebre y linfadenopatía) y posteriormente tras meses o años el parásito puede afectar al sistema nervioso central (somnia diurna e insomnio)<sup>8</sup>.

La enfermedad del sueño es endémica en 37 países de África, *Trypanosoma brucei gambiense* causa la enfermedad en 24 países de África occidental y central y *Trypanosoma brucei rhodesiense* que causa la enfermedad en 13 países de África oriental y sur. La enfermedad es, sobre todo, rural pero está apareciendo en zonas urbanas debido al éxodo rural, los conflictos y la facilidad de viajar. Alrededor de 300.000 a 500.000 personas están infectadas. Es una enfermedad poco frecuente en los turistas, aunque de vez en cuando se describen casos importados en Europa<sup>9</sup>.

El diagnóstico se establece mediante técnicas directas en fase aguda que se basan en el examen parasitológico de la sangre y del líquido cefalorraquídeo. Los métodos de diagnóstico indirecto son útiles cuando la enfermedad afecta al sistema nervioso central<sup>9</sup>.

## **OBJETIVO**

**Describir las diferentes técnicas de diagnóstico inmunológico de las tripanosomosis americana y africana disponibles y recomendadas en la actualidad.**

## **METODOLOGÍA**

Se ha realizado una búsqueda bibliográfica, consultando las bases de datos Medline, Scopus, uptodate, Pubmed y google académico. En la búsqueda se han incluido los siguientes términos:

“*T. cruzi*”, “*T. brucei*”, “diagnostico inmunológico tripanosomosis”, “epidemiología de las tripanosomosis”, “immunological techniques” “diagnostico enfermedad de Chagas”, “diagnóstico enfermedad del sueño”, “enfermedad de Chagas”, “enfermedad del sueño”, “tripanosomosis humana africana”, “técnicas inmunoserológicas”, “indirect diagnosis of *trypanosomas*”, entre otros.

Se han revisado abstracts, tanto en inglés como en español, de estudios publicados preferentemente desde el año 2011 hasta la actualidad. Los artículos fueron inicialmente seleccionados por el título y en segundo lugar por la lectura del resumen.

Al tratarse de un artículo de revisión no se ha realizado análisis estadístico pero sí se han tenido en cuenta en los resultados diferentes aspectos relacionados. En el marco teórico que se expone a continuación se mostrarán los principales hallazgos obtenidos tras la lectura crítica de la bibliografía consultada, donde se incluyen apartados específicos que hacen referencia a las técnicas de diagnóstico inmunológico de ambas enfermedades tropicales.

## RESULTADOS

### **Técnicas inmunológicas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas:**

Actualmente no existe una técnica de referencia para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda la realización de dos pruebas basadas en diferentes principios y antígenos. En caso de discordancia se deberá de realizar una tercera prueba para confirmar la infección <sup>2, 10</sup>. A continuación se detallan las diferentes técnicas diagnósticas más destacadas:

#### **a) Técnicas convencionales:**

Las técnicas indirectas más empleadas son: Inmunofluorescencia indirecta (IFI), hemoaglutinación indirecta (HAI) y el enzimoimmunoanálisis (ELISA). Estas pruebas de detección de anticuerpos son muy sensibles, pero su especificidad está limitada por su reactividad cruzada con anticuerpos de pacientes con otras parasitosis como leishmaniosis (enfermedad con la misma distribución geográfica que la enfermedad de Chagas)<sup>8</sup>. A continuación se detallan en que se basan estas técnicas citadas anteriormente, así como los antígenos que son necesarios para llevarlas a cabo y cómo interpretarlas:

##### **a.1) Inmunofluorescencia indirecta (IFI):**

Esta técnica inmunológica está basada en la reacción antígeno-anticuerpo. Emplea antígenos particulados, es decir, el parásito entero es fijado con formaldehído o glutaraldehído. La particularidad de esta técnica es que emplea un segundo anticuerpo (anti-anticuerpo humano) con una sustancia fluorescente, normalmente isotiocianato de fluoresceína. La lectura de los resultados de esta prueba debe realizarse en microscopio equipado con luz UV. Esta técnica ha demostrado tener una elevada especificidad que complementa y ratifica el resultado reactivo obtenido en el tamizaje de la infección <sup>12,13</sup>.

##### **a.2) Hemaglutinación indirecta (HAI):**

En esta técnica se sensibilizan glóbulos rojos con antígeno del parásito. Se basa en la propiedad que tienen las proteínas de adsorberse sobre la superficie de los glóbulos rojos de carnero o ave modificada químicamente, por ejemplo, ya que son estos los que actúan como antígenos. Si en el suero del paciente existen anticuerpos contra los antígenos del parásito, los glóbulos rojos se aglutinan. Este hecho permite observar los resultados a simple vista <sup>12,13</sup>.

### **a.3) Ensayo inmunoenzimático (ELISA):**

El objetivo de esta técnica es la detección cualitativa de anticuerpos IgG dirigidos contra *T. cruzi* en suero o plasma de humanos. Se realiza en placas cuyos pocillos han sido tapizados con extractos totales de las cepas de *T. cruzi* incluyendo antígenos de membrana altamente inmunogénicos. Posteriormente, se lava para eliminar proteínas séricas no involucradas en la unión antígeno-anticuerpo, se agrega un reactivo constituido por anticuerpo anti-inmunoglobulinas humanas marcado con una enzima (usualmente peroxidasa o fosfatasa alcalina). Si las muestras analizadas contienen anticuerpos específicos para *T. cruzi*, estos formarán un complejo estable con los antígenos que recubren los pocillos. Después de un período de incubación y nuevos lavados, los anticuerpos anti-IgG humanas marcados con peroxidasa se unirán al complejo formado. Finalmente, en la etapa de incubación con el sustrato cromogénico, la peroxidasa unida al complejo producirá una coloración que permitirá detectar las muestras reactivas para *T. cruzi*. Para la medición de esta intensidad de color es necesario contar con un espectrofotómetro de lectura vertical. La reacción se detendrá por medio de la adición de ácido sulfúrico. Eventualmente, en laboratorios de baja complejidad se puede efectuar la lectura visual. Esta técnica ha demostrado ser altamente sensible para el tamizaje de la infección<sup>12, 13</sup>.

Debido a que la prueba ELISA ha demostrado ser la técnica más sensible, a continuación se describirán distintas versiones de esta técnica:

- Prueba comercial de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) IgG-ELISA® (NovaTec Inmunodiagnostica GmbH):

Esta prueba utiliza como antígeno una proteína de fusión denominada TcF que codifica para cinco epítomos procedentes de antígenos distinta del parásito tales como TcD, PEP-2, TcLo1.2, Tce y una variante polimórfica de este último denominada TcHi29. Se determinaron los valores de absorbancia de dicha prueba comercial y se compararon los resultados positivos y negativos con otras pruebas serológicas tales como la IFI y ELISA convencional. El antígeno empleado fue un extracto total preparado a partir de epimastigotes de cultivo de una cepa previamente caracterizada. En la mayoría de los casos la prueba comercial de ELISA permitió diferenciar a los pacientes infectados de los individuos control con una clara y amplia diferencia en los valores estudiados. Los valores de absorbancia de los pacientes sintomáticos fueron significativamente más altos que los de los pacientes asintomáticos. Diversos estudios han demostrado la capacidad de estos epítomos de inducir

la respuesta inmune humoral en el curso de la enfermedad en pacientes con enfermedad de Chagas. La evolución de la técnica ELISA basada en el antígeno TcF mostró porcentajes de sensibilidad y especificidad de entre 98.94% y 100%<sup>3</sup>. Una de las aplicaciones más importantes de esta técnica de inmunodiagnóstico es su uso en zonas endémicas, en donde la prueba debe discriminar a los individuos infectados de aquellos que sin estarlo pueden tener otras condiciones que generen falsos positivos. Es por esto que, además del grupo de controles sanos, en diversos estudios se han incluido otros grupo control, tales como individuos con factores de riesgo quienes por vivir o haber vivido en zonas endémicas de la enfermedad pueden desarrollar respuesta inmune específica tanto humoral como celular frente al parásito, individuos infectados con *Leishmania* ya que este parásito comparte al pertenecer a la misma familia que *T. cruzi* comparte con este algunos de sus epitopos e individuos con enfermedad cardíaca no infectados<sup>3</sup>. Los resultados que se han obtenido indicaron que si bien estos individuos control presentaron valores de absorbancia similares a los del grupo de individuos sanos, en la mayoría de los casos se pudo discriminar entre individuos infectados y no infectados<sup>14</sup>.

- Kit ELISA Chagas IICS V.1:

Debido a la alta prevalencia de la enfermedad de Chagas y el riesgo de adquirir una infección por *T. cruzi* a través de una transfusión de sangre de donantes infectados impulsó al desarrollo de un kit de ELISA para el diagnóstico de la enfermedad a nivel local<sup>15</sup>.

Para validar la calidad de los resultados obtenidos en el diagnóstico serológico es esencial implementar controles tanto internos como externos, además el laboratorio debe realizar una elección adecuada de los test de diagnósticos antes de implementar su utilización en la rutina diagnóstica diaria<sup>15</sup>.

Al realizar el tamizaje serológico lo ejecutan de modo adecuado profesionales capacitados, siguiendo las buenas prácticas de laboratorio y utilizando pruebas diagnósticas de buena calidad e instrumentos bien calibrados, se obtienen resultados precisos y confiables, capaces de mantener el riesgo de transmisión de enfermedades dentro de límites aceptables<sup>15</sup>.

Entre las múltiples ventajas de la utilización del ELISA Chagas test IICS V.1 está su alta sensibilidad y especificidad: 97% y 99%, respectivamente<sup>15</sup>. El Chagas test IICS V.1 ha demostrado reunir los requisitos necesarios para ser empleado en el diagnóstico de la

enfermedad. Sin embargo, se ha visto la necesidad de seguir implementando mejoras al kit para que este pueda ser también aplicado a sistemas automatizados<sup>15</sup>.

- Chagastest ELISA lisado:

Se realiza diluyendo la muestra en la placa cuyos pocillos se encuentran sensibilizados con antígenos de *T. cruzi*, correspondientes a zonas altamente conservadas entre distintas cepas. Si la muestra contiene anticuerpos específicos, éstos formarán un complejo con los antígenos y permanecerán unidos a la fase sólida. La fracción no unida se elimina por lavado y luego se agrega el conjugado con peroxidasa), el cual reacciona específicamente con los anticuerpos anti-*T. cruzi* inmunocapturados. El conjugado no unido se elimina por lavado. La presencia de peroxidasa unida al complejo se revela mediante el agregado del sustrato cromogénico, tetrametilbencidina. Las muestras reactivas desarrollan color azul celeste. La reacción enzimática se detiene mediante el agregado de ácido sulfúrico, produciendo un viraje del color celeste al amarillo. Posteriormente se medirá la densidad óptica en forma bicromática a 450/620-650 nm o a 450 nm<sup>16</sup>.

La presencia o ausencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* se determina relacionando la absorbancia de la muestra respecto al valor del *cut-off*, definido como:  $\text{Cut-off} = \text{CN} + 0,200$  (CN: promedio de las D.O. del Control Negativo<sup>16</sup>).

Una muestra inicialmente reactiva puede ser no reactiva en las dos repeticiones. Esto puede deberse a contaminación cruzada de un pocillo no reactivo por una muestra reactiva, contaminación de la muestra durante la dispensación, imprecisión en el dispensado de muestra, conjugado y/o revelador en el pocillo, reutilización de tips, o contaminación del pocillo con hipoclorito u otros agentes oxidantes<sup>16</sup>.

En ciertos casos una muestra no reactiva puede presentar una reacción falsamente reactiva, tanto en el análisis inicial como en sus repeticiones. Algunas causas de este fenómeno pueden ser la contaminación de la muestra durante la extracción, procesamiento o conservación, presencia de sustancias interferentes, tales como autoanticuerpos, fármacos, etc, así como la dispensación y/o aspirado ineficiente de la solución de lavado (sistema obstruido)<sup>16</sup>. Este chagastest demostró mediante múltiples estudios una elevada especificidad, sensibilidad y precisión por lo que es una de las técnicas de elección para el diagnóstico de la enfermedad<sup>16</sup>.

- Test ELISA Chagas III:

Como en los otros casos, la muestra será positiva cuando la absorbancia sea mayor que el cut-off adquiriendo una coloración amarilla y, por el contrario será negativa cuando su absorbancia sea menor que el cut-off. En este caso el cut-off es igual a 0,391. Las muestras dudosas o positivas deben repetirse por duplicado<sup>17</sup>.

**b) Técnicas de Nueva Generación: Inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas (CMIA).**

El inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas (CMIA), comercializado como ARCHITECT Chagas®, se ha convertido en una alternativa para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en la rutina asistencial a las técnicas anteriores<sup>19</sup>.

En los estudio con las técnicas convencionales anteriores se emplean extractos crudos del parásito como antígeno, obteniendo resultados de sensibilidad que varían entre el 95% y el 100%. En las técnicas de nueva generación se utilizan antígenos y/o péptidos sintéticos, lo que supone una mejoría de la sensibilidad y especificidad, especialmente importante a la hora de evitar falsos positivos y negativos<sup>19</sup>.

Este ensayo emplea cuatro antígenos recombinantes que contienen 14 regiones antigénicas diferentes, que corresponden a los tres tipos morfológicos del parásito en su ciclo biológico que son las formas encontradas tanto en el hospedador como en el insecto vector. A su vez, este test es capaz de detectar 76 de 76 muestras que contenían anticuerpos anti-*T. cruzi* mostrando una sensibilidad del 100%. En el caso de las muestras negativas se detectó 86 de las 89 muestras, por lo que la especificidad es del 96,6%. Además, el índice de concordancia de este ensayo con las técnicas ELISA e IFI fue de 0,96 y 0,91 respectivamente<sup>19</sup>.

En conclusión, el ARCHITECT Chagas®, demuestra tener una sensibilidad y una especificidad similares a los tests ELISA e IFI utilizados en nuestra rutina diagnóstica. Gracias a una total automatización, permite procesar un mayor número de muestras, de manera más rápida, con una mayor estandarización y reproducibilidad de los resultados, así como una interpretación totalmente objetiva de los mismos.

### c) “Test rápidos”:

Desde hace años, existen varios test rápidos en el mercado, sin embargo, su especificidad, sensibilidad y practicidad no habían sido evaluados de forma independiente, sino solamente por parte de las empresas farmacéuticas que los producen. Recientemente se han publicado los resultados de un estudio promovido por la OMS y Médicos Sin Fronteras (MSF) entre otros, en los que han colaborado 11 laboratorios de referencia de diferentes zonas geográficas, y se ha evaluado el funcionamiento de 11 test rápidos comercializados para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. El estudio trata de evaluar tanto sensibilidad como especificidad, así como el fácil manejo de los mismos<sup>12</sup>.

Estos test emplean muestras de sangre, suero o plasma. Son cualitativos y sus principales ventajas son la facilidad de realización y menor coste, sin la necesidad de equipo eléctrico, personal de laboratorio especializado o refrigeración, y la rapidez, dado que permiten la entrega casi inmediata de resultados<sup>18</sup>.

De los 11 test evaluados, ocho de ellos obtuvieron una elevada especificidad y sensibilidad, similares a las de los métodos convencionales comentados anteriormente. De estos, se excluyeron 2 considerándose test semirrápidos, es decir, los resultados se observaron entre las 2 y 3 horas después de la aplicación de la muestra y que además, requerían para ello un mínimo de infraestructura y de personal entrenado. Los 7 tests más recomendables fueron: OnSite Chagas Ab Rapid test, WL Check-Chagas®, Typanosoma Detect™ Rapid Test, Chagas Quick Test®, SD- Chagas Ab Rapid®, Serodia® Chagas y Immunocomb® II Chagas Ab. De esta manera, el estudio concluyó con la recomendación de realizar el cribado y vigilancia de la enfermedad, pero teniendo en cuenta que los resultados deben de ser posteriormente confirmados por un laboratorio de referencia<sup>12</sup>.

### d) Técnica de confirmación: Western-blot.

Las pruebas de detección de anticuerpos mencionadas anteriormente, en conjunto han demostrado elevada sensibilidad. Sin embargo, cuando existe un conflicto diagnóstico (problemas de especificidad), por ejemplo por reacciones cruzadas con otras parasitosis, es necesario llevar a cabo esta técnica confirmatoria del diagnóstico<sup>10</sup>.

Los antígenos empleados en este caso son antígenos de excreción-secreción de epimastigotes de *T. cruzi* cepa C1 Arequipa. La interpretación de los resultados se realizó tomando los siguientes criterios de reactividad: a) para una muestra positiva se debe

observar coloración en una o más de las ocho bandas específicas. b) Un resultado es negativo si no aparece coloración en ninguna de las bandas<sup>10</sup>.

El uso de antígenos de excreción-secreción permitió aumentar la sensibilidad en relación a otras investigaciones con la misma u otras técnicas. La utilización de antígenos totales de epimastigotes o fracciones de epimastigotes en el diagnóstico serológico, pueden dar lugar a falsos positivos, principalmente debido a la reactividad cruzada con los anticuerpos desarrollados frente a otras enfermedades parasitarias. Estos problemas pueden ser superados mediante el uso de muestras que contengan antígenos específicos de *T. cruzi*, los que deben ser reconocidos por todos o la mayoría de los pacientes con enfermedad de Chagas<sup>10</sup>.

La especificidad de esta técnica alcanza el 100% y supera en todos los trabajos a la conseguida en las técnicas de ELISA, Hemaglutinación Directa e Inmunofluorescencia Indirecta, que son las más empleadas<sup>8</sup>. En cuanto a la sensibilidad se alcanzan valores del 95.4%, aceptables y comparables con los obtenidos por diversas investigaciones con esta técnica en la enfermedad de Chagas<sup>10</sup>.

La principal ventaja es que permite la selección y utilización solo de los antígenos específicos que son reconocidos por los anticuerpos en la circulación sanguínea. Además, dado que los antígenos de excreción-secreción constituyen un importante estímulo al sistema inmune del hospedador, rápidamente generan la producción de anticuerpos específicos, que pueden ser detectados permitiendo un diagnóstico precoz<sup>10</sup>.

La principal limitación de esta técnica es que resulta difícil realizar comparaciones entre laboratorios, principalmente debido a la heterogeneidad de las cepas y las preparaciones antigénicas utilizadas. Además, el tamaño de los geles, la concentración de poliacrilamida utilizada, así como los diferentes marcadores de peso molecular, proporcionan variaciones en la separación de las bandas y el establecimiento de los respectivos pesos moleculares<sup>10</sup>.

### **Técnicas inmunológicas para el diagnóstico de la enfermedad del sueño:**

En cuanto a la enfermedad del sueño, se caracteriza predominantemente por una infección temprana de la sangre y posteriormente por una fase de infección cerebral tardía. Durante ambas el parásito expresa un conjunto de glicoproteínas de superficie variables (VSGs) que se encargan de proteger el parásito de la respuesta inmune del huésped ya que

conduce a ondas cíclicas de parasitemia, ya que cada glucoproteína es reemplazada por una nueva VSG. Esta variación antigénica complica su diagnóstico y requiere la utilización de técnicas inmunológicas que resulten eficaces<sup>21</sup>.

Por esta razón, se han realizado estudios para el desarrollo y la evaluación de la capacidad diagnóstica de las técnicas, seleccionando antígenos en un formato múltiple. La ventaja del ensayo múltiple es que permite evaluar la capacidad diagnóstica de varios antígenos específicos de una enfermedad dada. Además, para conseguir que el diagnóstico sea lo más fiable posible, se han seleccionado proteínas sin alta variabilidad genética. El objetivo del estudio fue desarrollar un ensayo inmunológico para evaluar la vigilancia sero-epidemiológica<sup>21</sup>.

Se clonaron los *loci* de ocho antígenos de *T. brucei gambiense* y se expresaron estos genes en bacterias. Los antígenos fueron sometidos a este tipo de ensayos múltiples, utilizando sueros de los pacientes con la enfermedad del sueño para evaluar el potencial inmunodiagnóstico de los antígenos<sup>21</sup>.

El ensayo demostró datos variables en cuanto a sensibilidad y especificidad según el antígeno empleado. Estos resultados sugirieron que los pacientes con esta enfermedad producen anticuerpos heterogéneos contra antígenos variables después de la infección. La inclusión de varios antígenos ayudó a eliminar falsos negativos por el uso de un único antígeno. Además, la sensibilidad que se adquiere al realizar el diagnóstico se mejora notablemente<sup>21</sup>.

Los resultados demuestran la utilidad de aplicar ensayos múltiples para el desarrollo y evaluación de antígenos anti-*T. brucei gambiense* para uso en vigilancia sero-epidemiológica<sup>21</sup>.

En la actualidad hay diversos test serológicos que buscan anticuerpos anti-*T. b. gambiense* en el suero de los pacientes. Estas pruebas no pueden utilizarse para realizar un diagnóstico definitivo de la enfermedad debido a que tanto los valores de sensibilidad como de especificidad son variables, pero pueden ser un buen método de cribado. De estas pruebas serológicas la más empleada en el cribado de la enfermedad es la prueba de aglutinación con tarjeta para *T. b. gambiense* (CATT). Esta técnica se basa en la aglutinación de *Trypanosomas* liofilizados en presencia de un anticuerpo específico. Los datos de sensibilidad se encuentran entre 94-98%. Sin embargo, los datos obtenidos de especificidad dependen de si se usan diluciones de sangre entera o de plasma o de las reacciones cruzadas con anticuerpos contra otros *Trypanosomas* no patógenos. Las personas que son CATT positivas deben someterse a la aspiración de ganglios linfáticos<sup>23</sup>.

## DISCUSIÓN

Hasta el momento no disponemos de una técnica de referencia “gold standard” para el diagnóstico inmunológico para ninguna de las tripanosomiasis. En la Enfermedad de Chagas, se considera el diagnóstico cuando dos test diferentes resultan positivos.

Hasta el momento hemos visto que las técnicas inmunológicas convencionales o “tradicionales” IFI, HAI y ELISA en todas sus modalidades son pruebas diagnósticas que han demostrado alta especificidad y sensibilidad para el diagnóstico de esta tripanosomiasis. Las técnicas de nueva generación CMIA (Architect) muestran una capacidad diagnóstica similar a las pruebas convencionales y ofrecen mejoras en cuanto a su automatización y procesamiento de resultados. A su vez, se espera que determinados test rápidos se consoliden como prueba diagnóstica alternativa y/o complementaria a las anteriores. En caso de que dos de los test anteriores no coincidan en su diagnóstico debemos recurrir a una tercera técnica, el western-blot, para confirmar o descartar dicho diagnóstico.

Conviene recordar que las técnicas anteriores son útiles solo en la fase crónica de la enfermedad y presentan como desventaja común que no resultan útiles en el diagnóstico de Chagas crónico en pacientes con inmunodeprimidos ni en Chagas congénito debido a que los niveles de anticuerpos en el neonato (hasta más allá de 9 meses) proceden de la madre<sup>8</sup>.

El diagnóstico de esta enfermedad se realiza en función del lugar geográfico, de los recursos disponibles y del propósito del mismo. La elección de una técnica u otra depende, en gran medida, de si el diagnóstico se lleva a cabo en una zona endémica, América Latina y África, o no endémica, como por ejemplo España<sup>12</sup>.

Las zonas endémicas se caracterizan por tener, en general, recursos limitados y un gran número de pacientes en fase aguda, muchos de ellos en zonas geográficas aisladas y con falta de servicios básicos como electricidad o agua. Con frecuencia, los pacientes se encuentran en fase aguda con parasitemias elevadas. Por su bajo coste, se prefiere el diagnóstico parasitológico directo mediante microscopía. El diagnóstico inmunológico mediante técnicas convencionales se reserva para pacientes con sospecha de Chagas en fase crónica. Los test rápidos se han convertido en la esperanza para mejorar el infradiagnóstico de esta enfermedad en poblaciones sin recursos.

El mundo desarrollado se considera zona no endémica y suelen disponer de más recursos. La mayoría de los pacientes se encuentra en la fase crónica de la enfermedad, por

lo que los métodos inmunológicos son las pruebas diagnósticas habituales. Se dispone de hospitales altamente cualificados y laboratorios de referencia capaces de realizar todas las técnicas inmunológicas disponibles: test rápidos, convencionales y/o de nueva generación para el diagnóstico y western-blot para confirmación “en caso de empate”. Hasta el momento se solicitan en caso de sospecha clínica y en determinadas circunstancias como en bancos de sangre para transfusión y trasplante de órganos. En neonatos con madre enferma de Chagas se utilizan junto a la PCR. Por el contrario, en este entorno, no siempre estos recursos son accesibles. En ambientes rurales alejados de las grandes ciudades e incluso en la Atención Primaria no siempre es fácil acceder a estos estudios<sup>12</sup>.

Se necesita una mayor evidencia en el diagnóstico inmunológico de la enfermedad de Chagas para lo cual se esperan nuevos estudios de investigación. Al igual que sucede en otros ámbitos de la medicina, sería deseable disponer de métodos de cribado o screening y métodos diagnósticos. De forma, con un test de cribado negativo sería suficiente para descartar la enfermedad gracias a una sensibilidad y valor predictivo negativo cercano al 100%. Los test rápidos están llamados a convertirse a ser la prueba de cribado de elección, especialmente en áreas con pocos recursos, endémicas o no endémicas. En el caso de obtener un Test rápido positivo seguiría siendo necesario un segundo test, convencional o de nueva generación y de un tercer test en caso de discrepancia. Por el momento, se precisan al menos dos test positivos “en paralelo” y no “en serie”.

En cuanto al diagnóstico de la enfermedad del sueño se han encontrado problemas en ambas fases de la enfermedad, sobre todo relacionados con la enorme variación antigénica que llevan a cabo los parásitos mediante modificaciones en sus glicoproteínas de superficie (VSG)<sup>8</sup>. Por esta razón, nuestro sistema inmune es incapaz de detectar, identificar y eliminar al parásito, y se producen ondas cíclicas de parasitemia, al ser reemplazada cada VSG por una nueva. Es por ello, que se han llevado a cabo estudios que evalúan simultáneamente múltiples antígenos, que han demostrado tener altos valores de especificidad y sensibilidad<sup>20,23</sup>. Se necesitan nuevos estudios que aporten más luz y evidencia en esta enfermedad.

Antes de concluir no me olvido de reconocer las limitaciones que tiene este trabajo. No tiene el rigor propio de una revisión sistemática o de un metanálisis. A pesar de ello, considero que puede ser una puesta al día de interés para profesionales de la salud.

## CONCLUSIONES

En la tripanosomosis americana o enfermedad de Chagas:

- El diagnóstico inmunológico de las tripanosomosis tiene especial utilidad en la fase crónica de la enfermedad, cuando la carga parasitaria ha disminuido notablemente.
- Hasta el momento no disponemos de una técnica de referencia para el diagnóstico inmunológico. Según la OMS, se precisan dos test con resultados positivos y un tercero positivo en caso de discrepancia de los anteriores.
- Las técnicas de diagnóstico inmunológico tradicionales (ELISA, IFI, HAI) han demostrado ser elevadamente sensibles y específicas.
- Las Técnicas de Nueva Generación como el inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas (CMIA) son una alternativa a las anteriores con una serie de mejoras.
- Determinados Test rápidos se ofrecen como alternativa a los anteriores, especialmente útiles como test de cribado y en áreas con pocos recursos.
- En los casos de duda, al realizar el diagnóstico se necesita una tercera técnica inmunológica confirmatoria, el Western-blot.

En la tripanosomosis africana o enfermedad del sueño:

- La evidencia es más limitada que en la enfermedad anterior.
- Debido a la peculiaridad de *T. brucei* de cambiar constantemente sus glicoproteínas de superficie, el diagnóstico serológico de la enfermedad del sueño requiere técnicas que empleen múltiples antígenos, que excluyan la obtención de falsos negativos.
- Además, también existen pruebas rápidas útiles en el cribado de la enfermedad pero por sus variables valores de sensibilidad y especificidad, no deben de emplearse como técnicas para realizar un diagnóstico definitivo.

## BIBLIOGRAFIA

1. WHO [Internet], citado el 10 de enero de 2017. Disponible en:

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/es/>

2. L. Murcia, B. Carrilero, D. Saura, M.A. Íbora, M. Segovia. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013; 31(supl 1):26-34

3. B. Basso, E. Moretti. El laboratorio en el diagnóstico de la infección chagásica. *Rev Med Cine*. 2012 (1):1-23.

4. E. Ferrer. Técnicas moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Saber, Universidad de Oriente, Venezuela [Internet]. 2015 (citado 14 Enero 2017); 27(3): 359-371. Disponible en:

<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=427743080002>.

5. I. Molina, F. Salvador y A. Sánchez-Montalvá. Actualización en enfermedad de Chagas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016; 34(2): 132-138.

6. Mundo sano [Internet] Citado 20 de enero 2017. Disponible en: [www.mundosano.org](http://www.mundosano.org).

7. A. Monteagudo, C.E. Salazar. Tripanosomiasis en estudiantes latinoamericanos. *AMC*. 2013; 7(4): 435-452.

8. J. Roche. Situación actual de la tripanosomiasis humana en África. *Enf Emerg* 2004; 6(2):91-97.

9. E. Ferrer. M. Lares, et al. Comparación entre técnicas inmunológicas y moleculares para el diagnóstico de la enfermedad. *Enferm. Infec. Microbiol Clin*. 2013: 277-282.

10. H. Escalante, C. Jara, K. Davelois, M Iglesias, A. Benites, R. Espinosa. Estandarización de la técnica de western-blot para el diagnóstico específico de la enfermedad de Chagas utilizando antígenos de excreción-secreción de los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Peru Med Salud Pública*. 2014; 31(4):644-651.

11. A. Abras, M. Gallego, T. Llovet, S. Tebar, M. Herrero, P. Berenguer, et al. Serological diagnosis of Chronic Chagas Disease: Is it time for a change? *J Clin Microbiol* 2016; 54(6): 1566-1572.

12. M. de Villasante, P. Hernández. El diagnóstico de la enfermedad de Chagas. AMF 2015; 11(3):1 41-145.
13. C. Cuellar, A. Gómez- Barrio. Técnicas de inmunodiagnóstico. CFGS, Laboratorio de diagnóstico clínico y biomédico. Altamar. Barcelona. 2016: 44-69.
14. M. Liano, P. Pavía, et al. Evaluación preliminar de la prueba comercial Chagas IgG-ELISA en individuos colombianos. Biomédica 2014(34): 228-236.
15. L. Aria, M.E. Acosta, Y. Guillen, A. Rojas, T Meza, B. Infanzón. Desempeño del Kit ELISA Chagas IICS V.1 para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Memorias Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. 2016; 14(3): 7-13.
16. Grupo Wiener lab [Internet]. Chagatest ELISA lisado Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* (citado el 14 de enero 2017). Disponible en: [www.wiener-lab.com.ar](http://www.wiener-lab.com.ar)
17. GrupoBios-S.A [Internet]. Test Chagas III (citado el 10 de enero de 2017). Disponible en: <http://www.grupobios.cl>
18. C.L. Sánchez- Camargo, P. Alvajar- Viñas, P.P Wikins, et al. Comparative Evaluation of 11 Commercialized Rapid Diagnostic Tests for Detecting *Trypanosoma cruzi* Antibodies in Serum Banks in Areas of Endemicity and Nonendemicity. J Clin Microbiol. 2014; 52 (7): 2506-2512.
19. M.A. Iborra-Bendicho, M. Albert- Hernández, C. Márquez- Contreras. M. Segovia- Hernández. ARCHITECT Chagas<sup>®</sup>: una nueva herramienta diagnóstica en la enfermedad de Chagas. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012; 30(8): 463-465.
20. S. Muuo, Y. Fujii, M. Miura, M. Itoh, AW. Mwangi, M. Mwau, et al. Development of multiplex serological assay for the detection of human African trypanosomiasis. Parasitol Int. 2016; 65 (1): 121-127
21. S. krishana, MA, MBChb, et al. Clinical manifestations, diagnosis, and treatment of African tripanosomiasis [Internet]. Uptodate (citado 20 de Enero 2017). 2016; Disponible en: <http://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-diagnosis-and-treatment-of-african-trypanosomiasis>.

22. C. Valdez, F. Guadalupe. Diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas (Chagas congénito y en donantes de sangre): validación del antígeno Hierro Superóxido Dismutasa excretada (Fe-SODe) de *T. cruzi* [tesis doctoral]. Granada. Universidad de Granada, tesis doctorales. 2015.

23. J. Bretón, C. Delma, N. Torrico, et al. Aplicación de topología molecular a la predicción de la actividad frente a *Trypanosoma brucei rhodesiense* de compuestos bicíclicos derivados de la 4-metilpiperazina. *Neireis*. 2015; 7 (1): 27-37.