



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

TÍTULO:

**LA ENFERMEDAD DE CHAGAS
FUERA DE SUS FRONTERAS**

Autor: Laura Vallejo Nares

Tutor: Alicia Gómez Barrio

Convocatoria: Junio 2016

1. RESUMEN

La Enfermedad de Chagas es una patología importada por inmigrantes en nuestro país y principal endemia en Latinoamérica. Para su correcto diagnóstico debe interactuar todo el equipo de salud y evaluar los datos clínicos, de laboratorio y epidemiológicos. Es importante resaltar que el laboratorio juega un rol fundamental y muchas veces determinante en el diagnóstico de la infección. Por ello, es imprescindible conocer dos aspectos cruciales, de acuerdo a los objetivos del estudio: cuándo realizar un análisis y qué pruebas efectuar.

Se realizó una revisión bibliográfica de los métodos y protocolos de diagnóstico más eficaces para la EC. El diagnóstico debe ser rápido, selectivo y específico como Architect Chagas®. El idóneo sería la combinación de las técnicas parasitológicas (sangre), inmunológicas (ELISA, IFI, HAI) y moleculares (PCR, HRM) en función de la fase de EC.

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La enfermedad de Chagas (EC) es una antropozoonosis causada por un protozoo hemoflagelado, *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (*T. cruzi*), incluido en el orden Kinetoplastida y en la familia Trypanosomatidae. Es endémica en una amplia región de Latinoamérica, afectando a 22 países (Santos et al., 2016), y vinculada con aspectos socioeconómicos y culturales deficitarios (ya que el vector se encuentra en áreas rurales). Aproximadamente 7 millones de personas de estas zonas están afectadas (Luz et al., 2015).

La **principal vía de contagio en Sudamérica** es por contacto directo con el vector. Éstos son artrópodos reduvídeos hematófagos, de los cuales *Triatoma infestans* es el más importante desde el punto de vista epidemiológico. Transmiten el parásito al picar para alimentarse de sangre porque defecan sobre la piel o mucosas. El parásito, que está en las heces, se introduce en el organismo cuando el individuo se toca o se rasca la picadura (Cobo, 2006; Pueyo Sánchez, 2010). En menor medida, se puede transmitir por ingesta del parásito en alimentos contaminados- vía oral. **Fuera de los hábitats de los reduvídeos y en zonas urbanas**, las vías que predominan son: congénita, transfusión de sangre infectada, trasplante de órganos contaminados o accidente de laboratorio (Murcia et al., 2013).

En las últimas décadas, debido a los flujos migratorios poblacionales, ha aumentado el número de personas diagnosticadas de la EC en áreas no endémicas como Norteamérica, países del pacífico occidental y europeos. De Europa, España es el país más afectado y se

estima que entre 50.000 y 70.000 personas padecen la EC (Roca Saumell et al., 2015; Blasco-Hernández et al., 2016).

2. 1. CICLO BIOLÓGICO:

La **infección por *T. cruzi*** se produce cuando los tripomastigotes metacíclicos entran en contacto con la sangre y penetran en células del sistema inmunitario (macrófagos) por fagocitosis. Ahí se transforman en amastigotes y se multiplican en el citoplasma celular. Antes de salir de la célula, vuelven a la morfología de tripomastigotes de nuevo y se liberan rompiendo la célula. Alcanzan la circulación y se diseminan por el organismo dando lugar a la **parasitemia**. Desde la sangre pueden penetrar en diferentes células corporales.

2. 2. ESTADÍOS DE LA EC:

En la **primera fase o fase aguda** el 95 % de los casos son asintomáticos y dura entre 30- 90 días (Márquez et al., 2013). En los casos sintomáticos, 5 %, las manifestaciones son:

- Signo de Romaña- si el vector succiona la sangre en la zona periorbital- y Chagoma.
- Síndrome febril inespecífico: es el conjunto de signos y síntomas caracterizado por fiebre de menos de 7 días de duración y se acompaña de 2 o más de los siguientes signos: dolor de cabeza y/o detrás de los ojos, malestar general, dolor articular y/o muscular, diarrea, vómitos, falta de apetito y náuseas, manchas en piel, petequias, leucopenia, trombocitopenia.
- Linfadenopatías, adenomegalias, hepatoesplenomegalia.
- Miocarditis: puede aparecer dolor torácico y signos de insuficiencia cardíaca y, en la radiografía de tórax un aumento de la silueta cardíaca. En el electrocardiograma (ECG) pueden detectarse alteraciones del ritmo, bloqueos auriculoventriculares, complejos QRS con bajo voltaje y ondas T negativas.
- Meningoencefalitis, que cursa con: fiebre, crisis epilépticas, parálisis y coma.

Se caracteriza por elevada parasitemia, detectable por: métodos parasitológicos directos o reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Imaz-Iglesia et al., 2015).

Las formas más graves se asocian a: déficits nutricionales, inmunosupresión (SIDA), edad inferior a 5 años y brotes de transmisión oral, que se cree que suelen ir asociados a inoculación de cargas parasitarias más elevadas (Pueyo Sánchez, 2010). La fase aguda en países no endémicos solo se puede observar en neonatos por transmisión congénita, personas trasfundidas o trasplantadas (Roca Saumell et al., 2015).

Si la infección no ha sido tratada, se puede pasar a la **segunda fase: crónica o indeterminada**, quedando latente durante décadas o toda la vida del paciente.

1. Forma indeterminada: aparece aproximadamente en el 70-80 % de los infectados, es asintomática y los enfermos se caracterizan por:

- a. Pruebas serológicas positivas o diagnóstico parasitológico confirmado
- b. Ausencia de señales y de síntomas de EC
- c. ECG convencional normal y radiografías normales de corazón, esófago y colon

La infección se puede reactivar con la concomitancia de una enfermedad grave o en condiciones de inmunosupresión severa por trasplante de órganos o SIDA.

2. Forma sintomática: se da hasta en el 20-30 % de los casos. Puede cursar con:

- a. Forma cardíaca. Lesión del músculo cardíaco, engrosamiento cardíaco, arritmias; el 30 % (Herrador et al., 2015; Connors et al., 2016). La miocarditis crónica es lenta y progresiva, se manifiesta por cardiomegalia visible con una radiografía de tórax y con el tiempo, conduce a un cuadro de fibrosis miocárdica que puede desencadenar arritmia ventricular.

Síntomas: trastornos del ritmo cardíaco, aneurismas ventriculares, cardiopatía congestiva y tromboembolias. Puede llegar a producirse fallo cardíaco y muerte súbita (Murcia et al., 2013).

- b. Forma digestiva, neurológica (menos del 5 %) o combinada. Alteraciones del tracto digestivo como megaesófago y megacolon; hasta un 10 % (Kannen, 2015). Son consecuencia de una lesión del sistema nervioso entérico que produce dilatación del tubo digestivo (megaesófago, megaestómago, megaduodeno, megayeyuno, megafleon, megacolon) y trastornos motrices gastrointestinales, como acalasia esofágica, alteraciones del vaciado gástrico, alteración del tránsito intestinal y colestasis (Murcia et al., 2013).

Síntomas:

- Megaesófago: disfagia, odinofagia, dolor torácico y regurgitación.
- Megacolon: estreñimiento crónico y dolor abdominal.

- c. Imágenes radiográficas anormales de corazón, esófago y colon.

La inflamación crónica, a la larga, condiciona la disfunción autonómica, microinflamaciones y fibrosis de los órganos afectados, produciendo lesiones irreversibles. En el origen de este daño tisular puede encontrarse (Pueyo Sánchez, 2010; Roca Saumell et al., 2015):

- El efecto patogénico directo del parásito.
- Un efecto destructivo mediado por anticuerpos (Ac) propios.
- Alteraciones de la microcirculación.

La parasitemia es indetectable y no es constante por lo que los métodos serológicos son los más indicados para el diagnóstico en estos casos (Imaz-Iglesia et al., 2015): destacan hemoaglutinación indirecta (HAI), ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y test de inmunofluorescencia indirecta (IFI) (Angheben et al., 2015).

Existe tratamiento para la EC con benznidazol o nifurtimox. Son extremadamente tóxicos y tienen efectividad limitada cuando la enfermedad es crónica (80 % de fracasos). Aunque sí es efectivo en la reducción de la transmisión congénita en fase aguda (80 % de éxitos) (Blasco-Hernández et al., 2016).

3. OBJETIVOS

Actualizar los protocolos y métodos de diagnóstico de la enfermedad de Chagas en España para evitar el contagio y contribuir de forma global a eliminar la enfermedad. El diagnóstico de laboratorio tiene un papel importante en el control y hay que saber: **cuándo realizar un análisis y qué pruebas efectuar.**

4. METODOLOGÍA

Revisión exhaustiva de la evidencia científica disponible utilizando (*PubMed, Scielo, Elsvier, Scholar Google*). Además de analizar distintas guías clínicas de España y de algunos países latinoamericanos sobre protocolos de actuación.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi, diagnóstico enfermedad de Chagas, enfermedad de Chagas en España, PCR, HRM, Architect Chagas®.*

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desde el comienzo del siglo XXI, los movimientos migratorios han hecho que la EC se extienda fuera de sus fronteras, se ha diagnosticado un número creciente de personas enfermas en áreas no endémicas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que 10.000 personas mueren por la EC cada año (Blasco-Hernández et al., 2016). La mortalidad y morbilidad asociada tienen una consecuencia económica global de 7,2 mil millones de

dólares (Connors et al., 2016). Por ello, el diagnóstico debe ser eficaz y prevenir el contagio a otras personas por trasplantes, sangre infectada o vía congénita.

Independientemente de la vía de transmisión de *T. cruzi*, cuando éste ingresa en el organismo, cumple sus primeros ciclos de desarrollo en el hospedador, que comprenden entre 7 a 15 días- periodo de ventana- tras el cual se pueden detectar tripomastigotes. Es indispensable conocer dicho periodo para evitar la realización de estudios parasitológicos y/o serológicos en un momento inadecuado, con la consecuencia de posibles resultados falsos negativos.

Tras el tiempo de latencia, comienza la fase aguda, y como se indica en la Figura 1, las pruebas parasitológicas presentan una sensibilidad (S) superior al 95 %, las cuales pueden llegar al 50 % o menos en el periodo crónico de la enfermedad.

A partir de los 30 días y durante todo el curso posterior de la infección, las pruebas serológicas presentan una S cercana al 100 % al poder detectar Ac contra el *Trypanosoma*.

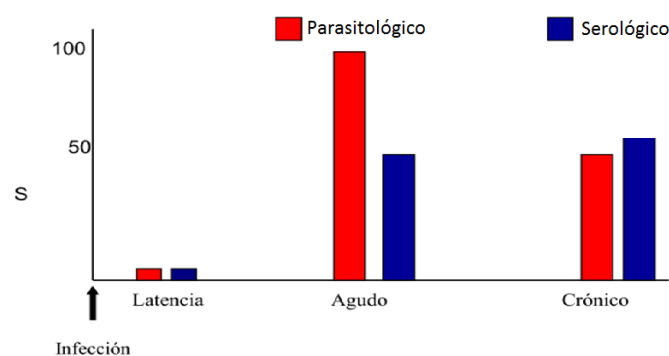


Figura 1: sensibilidad de las técnicas de diagnóstico en las 3 fases de la EC, según el estudio de Basso y Moretti (2015)

En el diagnóstico, es necesario considerar los antecedentes epidemiológicos del paciente que indiquen el posible contacto directo o indirecto con el parásito, y las evidencias clínicas (aunque más del 50 % son asintomáticos). Siempre requiere confirmación mediante la detección del parásito o pruebas serológicas.

Fuera de América Latina continental, la población idónea de diagnóstico son: **adultos autóctonos** o que hayan vivido **largas estancias** en estos países, según la Figura 2.

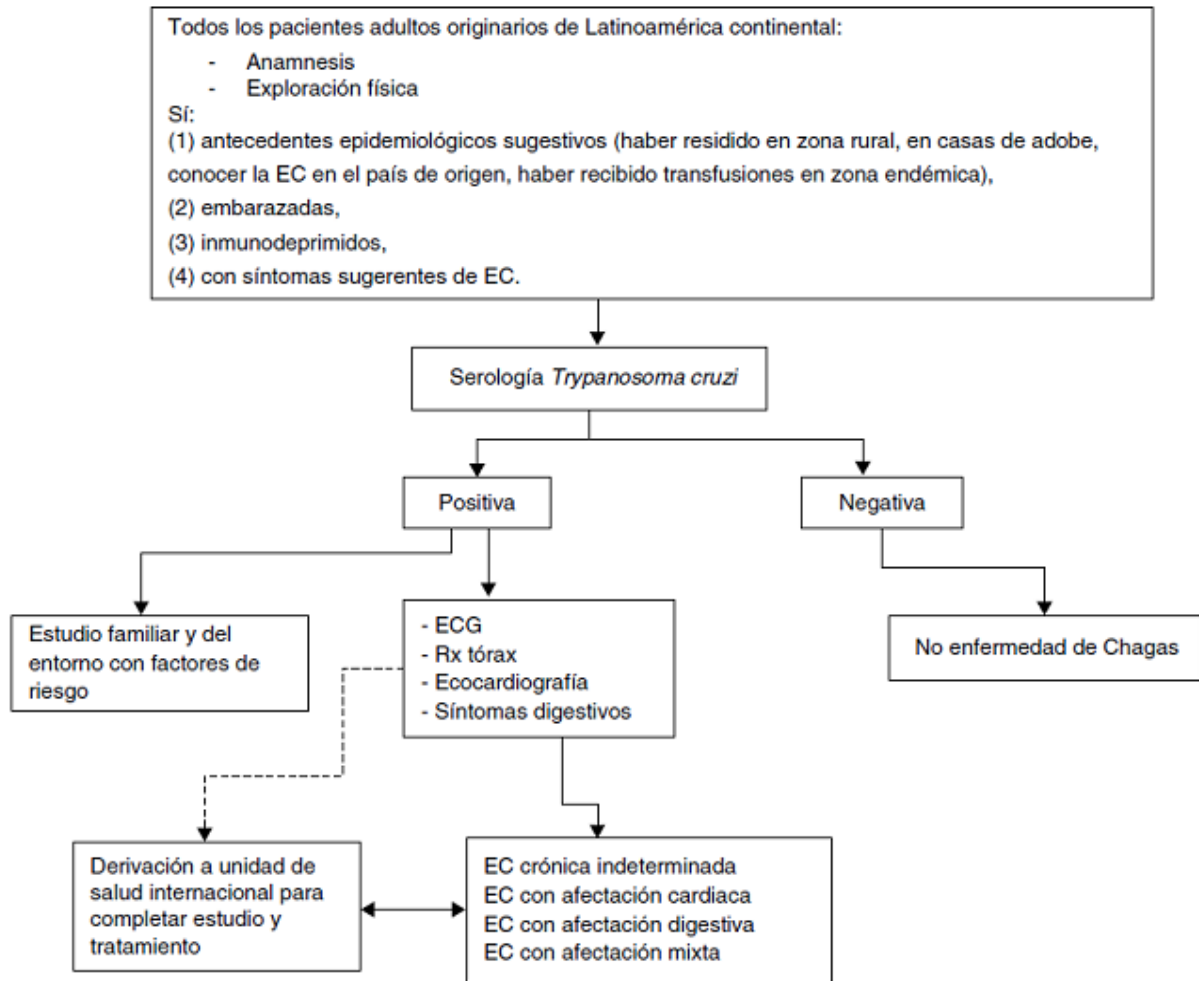


Figura 2: Abordaje de la EC en población adulta en atención primaria de salud en España (Roca Saumell et al., 2015). Rx: radiografía.

Si es **población pediátrica**, Figura 3, se debe diagnosticar la enfermedad lo antes posible porque la morbilidad y la mortalidad son más graves en niños menores de 5 años. Serán susceptibles de estudio niños en edad de 0-14 años, con los siguientes antecedentes epidemiológicos:

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

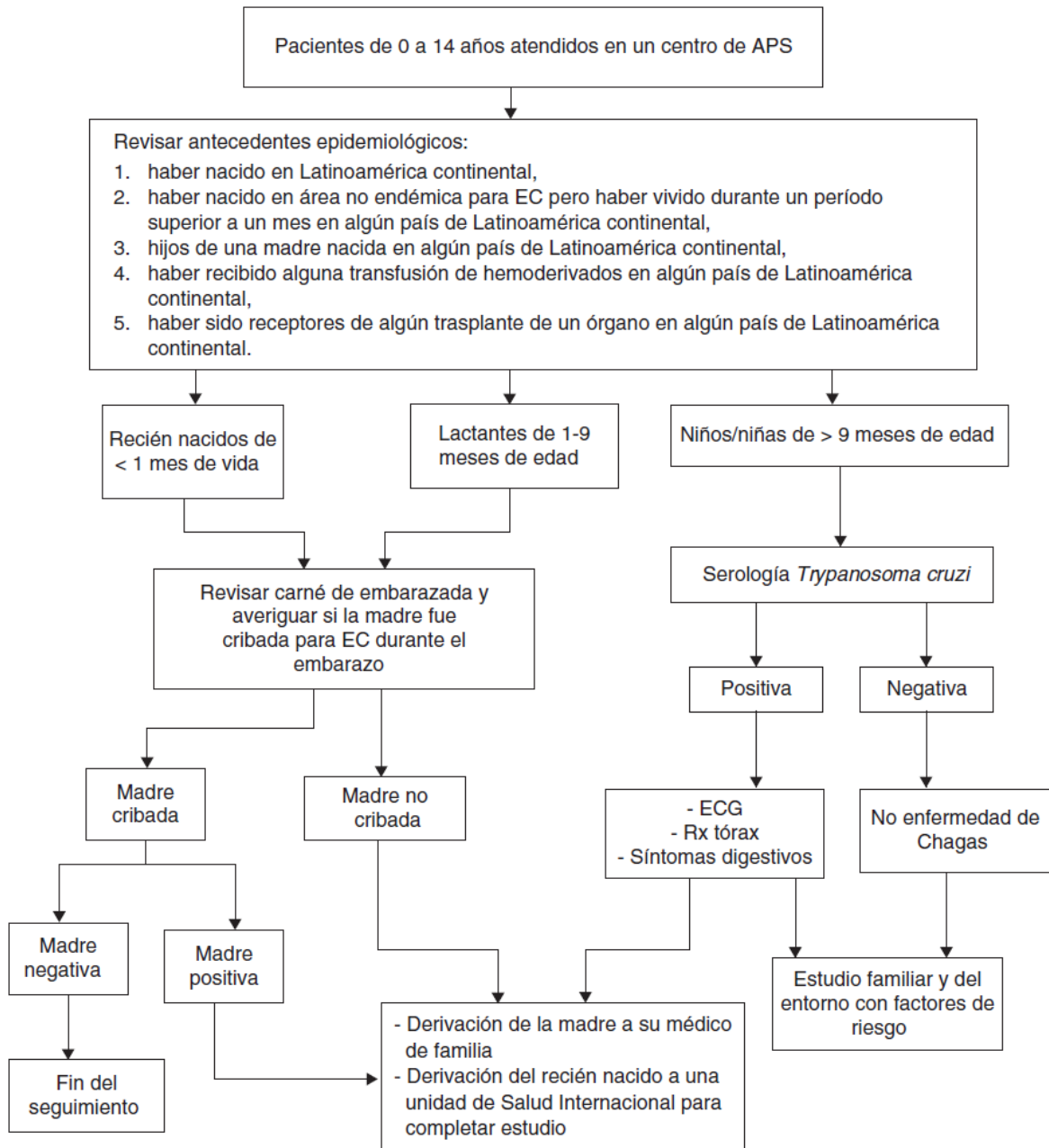


Figura 3: Abordaje de la enfermedad de Chagas en población pediátrica en atención primaria de salud en España (Roca Saumell et al., 2015) APS: atención primaria de salud; Rx: radiografía.

5. 1. DIAGNÓSTICO DE PRESUNCIÓN (RELATIVO)

No es necesaria la aparición de una sintomatología clínica para diagnosticar la EC dada la frecuencia de enfermos asintomáticos o con síntomas inespecíficos. Se distingue entre **infección** con antecedentes epidemiológicos y pruebas de laboratorio positivas y **enfermedad** si aparecen síntomas característicos.

Es **presumible una posible EC** cuando hay signos y síntomas evidentes de:

- Afectación cardíaca, cuyo diagnóstico debe realizarse mediante estudios con ECG y radiografía de tórax y se recomienda ecocardiografía. En caso de detectar anomalía, se puede someter al paciente a otras pruebas indicadas por los servicios de cardiología, complementarias y optativas: estudio *Holter* de 24 horas, prueba de esfuerzo, coronariografía o biopsia miocárdica (Pueyo Sánchez, 2010). En la Imagen 1 se ve una biopsia de músculo cardíaco.

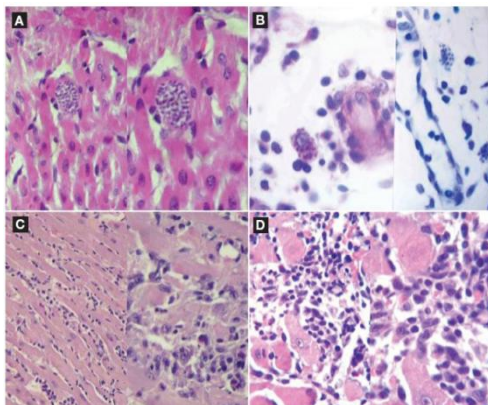


Imagen 1: Imágenes histológicas de miocardio. **A y B:** día 7 post-infección, nidos de amastigotes en ausencia de infiltrado inflamatorio. **C y D:** día 14 post-infección. **C:** fibras miocárdicas distorsionadas por la presencia de infiltrado inflamatorio constituido por linfocitos y macrófagos, miocarditis moderada. **D:** miocarditis intensa (Tartalini et al., 2011).

- Afectación digestiva chagástica. El cribado se lleva a cabo haciendo una evaluación del colon mediante esofagograma- teniendo en cuenta las técnicas de Rezende- y enema opaco- teniendo en cuenta las técnicas de Ximenes. Se podrían hacer estudios complementarios de: parásitos en heces- por si los síntomas atribuidos a la EC son causados por parásitos intestinales, manometría esofágica y endoscopias para valorar el estado de la mucosa esofágica (Pueyo Sánchez, 2010; Roca Saumell et al., 2015).

En neonatos, la sintomatología puede aparecer progresivamente, por lo que se deben realizar controles clínicos durante las primeras semanas de vida. Debe determinarse el grado de afectación cardíaca, neurológica o respiratoria (Pueyo Sánchez, 2010). Criterios:

| Generales |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"> - Apgar < 5 a 1 min / < 7 a los 5 min - Bajo peso al nacer: < 2.5 g - Fiebre (> 37,5 °C) o hipotermia (< 35 °C) - Linfadenopatía - Esplenomegalia y/o hepatomegalia - Ictericia - Hemorragias cutáneas (petequias) o edemas masivos |
| Signos de meningoencefalitis |
| <ul style="list-style-type: none"> - Irritabilidad - Llanto quejumbroso |

| |
|--|
| - Apatía - Crisis convulsiva - Fontanela tensa |
| Signos de miocarditis |
| - Distermia - Hipofonesis de ruidos cardíacos - En radiografía de tórax: cardiomegalia - ECG: bajos voltajes de QRS, prolongación de PR o QT, taquicardia sinusal con cambios primarios de onda T |
| Distrés respiratorio: |
| - Polipnea o hipoventilación simétrica bilateral - Cianosis - Frecuencia respiratoria rápida - Hiporreactividad a estímulos - Hipotensión arterial (Presión arterial sistólica, PAS < 75 mm Hg) - Tórax: volumen pulmonar disminuido, caja torácica campaniforme, patrón reticulogranular difuso y homogéneo y broncograma aéreo que sobrepasa la silueta cardíaca. En los casos más graves el pulmón está totalmente opaco y casi no se distingue la silueta cardíaca. |
| Analíticos: |
| - Linfocitosis (> 24.000 cel/mmc) o linfopenia (< 10.000 cel/mmc) - Anemia ferropénica - Velocidad de sedimentación globular (VSG) elevada - Hipoalbuminemia - Proteinuria - Elevación de transaminasas |

5. 2. DIAGNÓSTICO DE CERTEZA (ABSOLUTO):

Conjunto de pruebas de laboratorio que determinan la infección por *T. cruzi*. Puede efectuarse a través de test parasitológicos directos o indirectos (aíslan el tripomastigote), métodos moleculares y métodos serológicos (Pueyo Sánchez, 2010).

- **Test parasitológicos directos:** examen en fresco, gota gruesa, frotis y concentración de Strout. El que más S tiene es el examen en fresco; es el más simple y consiste en examinar una gota de sangre al microscopio entre un porta y un cubre. Sin embargo, el valor predictivo positivo depende del grado de parasitemia. La técnica de concentración de Strout se realiza en sangre obtenida sin anticoagulante y se analiza el sedimento de glóbulos rojos y blancos para observar al tripomastigote. En neonatos, esta técnica se realiza con un volumen de sangre menor.
- **Métodos parasitológicos indirectos:** cultivo de biopsias en medio *Novy-MacNeal-Nicolle*, y los hemocultivos en medio *Liver Infusion Tryptose (LIT)* o infusión cerebro-corazón; son métodos específicos pero tienen baja S (20-50 %; Margioto Teston et al., 2016). El hemocultivo es el método de elección en la población neonatal- fase aguda de EC- porque aporta mayor precocidad de resultados ya que se observa entre los 7 y 21 días (Basso y Moretti, 2015). El xenodiagnóstico se utiliza en investigación y se

requieren 10 ninfas de *T. infestans* para que se alimenten de la persona sospechosa y se buscarán las formas tripomastigotes en las deyecciones. Éste es útil en todas las etapas de la enfermedad con una S aproximada de 98-100 % en la fase aguda y 50-70 % en la crónica (Werner et al., 2008). Los pacientes diagnosticados de EC crónica basado en el análisis serológico, tienen hemocultivo y xenodiagnóstico negativo; por lo que no son técnicas de elección.

- **Métodos parasitológicos moleculares:** se basan en la detección de secuencias específicas de ADN del parásito. Se han descrito varias dianas de amplificación, siendo las más utilizadas por su alta S y especificidad (E), las PCR que amplifican el ADN satélite y el ADN de minicírculo de kinetoplasto de *T. cruzi*. Se incluyen: PCR cualitativa, cuantitativa y en tiempo real.

Ventajas: útil en casos agudos, crónicos, inmunodeficiencias, donantes de órganos (en los cuales la serología no es útil por los bajos niveles de Ac) y en la evaluación y seguimiento del tratamiento. Es esperable mayor S en técnicas de PCR en pacientes en fase aguda, ya que existe mayor parasitemia y, por lo tanto, se puede detectar el ADN parasitario. En la fase crónica, debido a la escasez de parásitos circulantes- se confinan a tejidos- las pruebas de PCR presentan menor S. Sin embargo, es importante resaltar que en la S también influyen el método de extracción de ADN y el volumen de sangre que se emplea.

Estos métodos nos permiten identificar al *T. cruzi* y asignar el genotipo o tipo de unidad discreta de tipificación (DTU). Para definir qué DTU es, se amplían distintas regiones de genes específicos como: gen minexón, la región del dominio variable del gen codificante para el ARNr 18S, región del dominio divergente del gen codificante para el ARNr24S (Manrique-Abril et al., 2013).

Inconvenientes: no es una técnica actualmente validada (Basso y Moretti, 2015) porque hay una gran variabilidad en la S, sumado a algunas limitaciones en cuanto a costo e infraestructura necesaria (Ferrer, 2015; Margioto Teston et al., 2016).

- **Métodos serológicos:** basados en la determinación de Ac contra antígenos (Ag) específicos: hemaglutinación indirecta (IHA), inmunofluorescencia indirecta (IFI), técnicas de ELISA y transferencia de Western.

ELISA es el más usado porque tiene un alto nivel de automatización y flexibilidad para usar con distintos Ag. Estos Ag son de epimastigotes de *T. cruzi*, forma que se

multiplica en el vector, se adhieren a inmunoglobulinas del suero y son evidenciadas por una segunda inmunoglobulina con reacción colorimétrica.

IFI permite detectar Ac en diferentes muestras biológicas y se observa la reacción en un microscopio de fluorescencia.

Las técnicas de ELISA e IFI fueron las que mostraron mayor cantidad de positivos, tanto en la fase aguda como en la crónica según la comparación de técnicas moleculares elaborada por Ferrer et al. (2012). Estas pruebas presentaron falsos positivos que correspondieron a individuos con Leishmaniasis visceral. La S de las pruebas inmunológicas en fase aguda fue menor que en fase crónica, como se esperaba según la Figura 1.

Los métodos serológicos mencionados, tienen alta S y E en inmunocompetentes. Las muestras que resulten positivas deben ser enviadas al laboratorio de Referencia de Parasitología del Instituto de Salud Pública (ISP) o a los centros autorizados por éste para su confirmación. En el caso de donantes chagásicos provenientes de tamizaje (ELISA-IFI), debe realizarse una contramuestra (Figura 4).

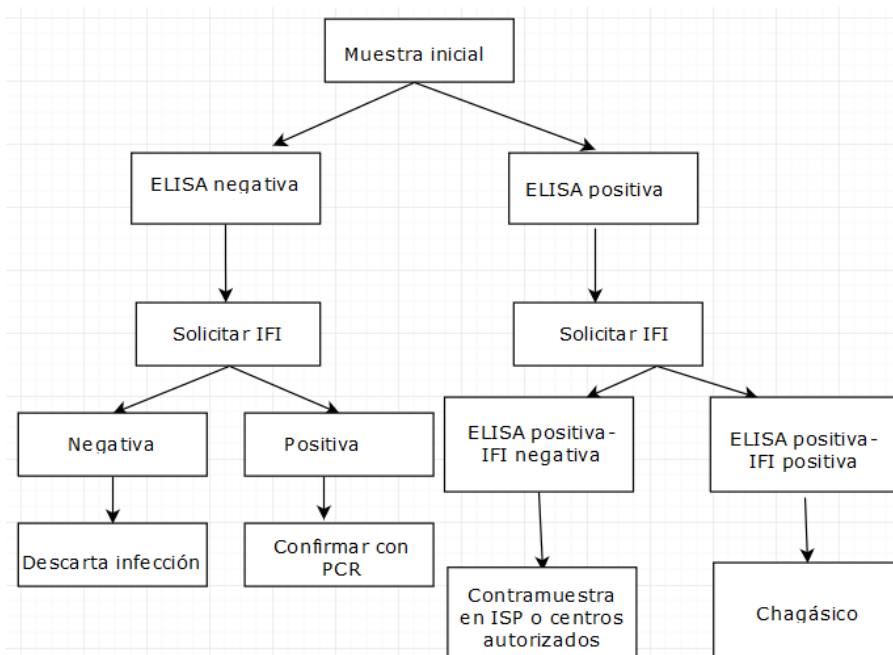


Figura 4: Algoritmo para el diagnóstico de laboratorio de EC en pacientes inmunocompetentes. Guías clínicas de la enfermedad de Chagas (2008). ISP: instituto de salud pública.

La detección de Ac es el principal método de diagnóstico de la EC en bancos de sangre. El inconveniente fundamental de estos test es el amplio rango de S y E que presentan dependiendo del método y Ag usado. Siempre se requiere la confirmación serológica mediante **dos métodos** que utilicen **Ag distintos** para efectuar el diagnóstico definitivo. En caso de discrepancia, se debería utilizar una tercera técnica.

Existen reactivos comercializados para el diagnóstico serológico de la infección por *T. cruzi* desde el año 2000. Uno de los ensayos más sensibles y específicos es **ARCHITECT Chagas**® (Iborra-Bendicho et al., 2012), el cual fue estudiado como test individual para el diagnóstico de la EC crónica por el Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid (Rebollo et al., 2014). Emplea 4 Ag recombinantes (TcF, FP3, FP6 y FP10) que contienen 14 regiones antigénicas diferentes. Estas regiones representan las 3 morfologías del parásito en su ciclo biológico- amastigote, tripomastigote y epimastigote- formas encontradas tanto en el insecto como en el hospedador. Architect Chagas® permite el diagnóstico de EC tanto en fase aguda como crónica. La diversidad antigénica constituye la base de su elevada S (100 %). A pesar de tener menor E (96,6 %) que el resto de las pruebas (ELISA, IFI), el ensayo Architect Chagas® muestra una clara discriminación entre muestras positivas y negativas, lo que la convierte en una técnica adecuada para el diagnóstico y puede ser admitida como técnica de cribado.

Además, la total automatización del test 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.

Con los métodos de diagnóstico convencionales se pueden dar falsos positivos por reacciones cruzadas con *Leishmania spp*, *Trypanosoma rangeli*, *Treponema pallidum* o *Plasmodium spp*. ya que estos parásitos comparten epítomos antigénicos. Pero según un estudio de 2015 hay un método serológico de citometría de flujo no convencional, denominado *FC-TRIPLEX Chagas/ Leish IgG1*, que usa Ag de leishmaniasis visceral y de EC basado en un algoritmo de análisis de IgG1 anti-Trypanosomatidae. Este método serológico aporta nuevas posibilidades para resolver resultados serológicos inconclusos debido a la velocidad, precisión y reproducibilidad. Es especialmente útil para aquellos individuos que procedan de áreas endémicas tanto de *T. cruzi* como de *Leishmania spp* (Teixeira-Carvalho et al., 2015). Es más relevante para zonas latinoamericanas.

El diagnóstico debe ser rápido, selectivo y específico como Architect Chagas®. El idóneo sería la combinación de las técnicas parasitológicas (sangre), inmunológicas (ELISA, IFI, HAI) y moleculares (PCR, HRM).

5. 3. DIAGNÓSTICO DE GRUPOS ESPECIALES

Tenemos dos situaciones principales de riesgo: embarazo y recién nacidos.

Si es una **mujer embarazada** con riesgo endémico de infección, el cribado se hace mediante una prueba serológica durante el primer trimestre de embarazo, entre las 8 y 12 primeras semanas de gestación. Si la primera visita es posterior a las 12 semanas de embarazo, se hará en la primera analítica una prueba serológica de la EC.

La **prueba serológica** de cribado será un **ELISA** con Ag completo, cuyos valores de S de las distintas prestaciones oscilan entre 98 % y 100 %, mientras que los valores de las E oscilan entre 97 % y 100 %. (Pueyo Sánchez, 2010).

Si la prueba sale negativa, la paciente deberá seguir el control clínico habitual del embarazo. Si por el contrario, es positiva, debe realizarse una prueba serológica de confirmación, se recomienda que sea objetiva y con un Ag distinto del que se ha utilizado en la prueba de cribado. Se propone realizar un **ELISA recombinante**, basado en Ag recombinantes que combinan epítomos representativos de diferentes estadios del *T. cruzi*, para la detección de Ac.

En caso de discrepancia entre las pruebas de cribado y de confirmación diagnóstica, debe realizarse una tercera prueba, una **IFI** aunque podrían elegirse otras pruebas con rendimientos similares en función de la experiencia de los laboratorios. La S de la IFI es del 95 %, y la E del 100 %, pero su lectura depende del técnico.

Estas pruebas serológicas tendrán que llevarse a cabo por laboratorios especializados y cualificados con experiencia.

Además, como pruebas complementarias se puede hacer una **PCR** a partir de las muestras de sangre y de las cepas aisladas de los hemocultivos positivos. La finalidad es comprobar la integridad del ADN y detectar la presencia de inhibidores de la muestra.

Cuando las pruebas confirman que la mujer presenta infección por *T. cruzi* debe realizarse la valoración del estado clínico para evaluar la forma de la enfermedad (indeterminada, cardíaca, digestiva u otras). Según el estado de gestación, se realiza un ECG y retrasa el resto de pruebas radiológicas. El estudio y el seguimiento los puede llevar a cabo un médico de atención primaria (o el médico del hospital de referencia), con posterior derivación al especialista correspondiente, si es necesario.

El embarazo no tiene por qué complicarse especialmente. Debe seguirse el control habitual, pero es recomendable asegurar la visita con el obstetra. En caso de que la mujer presente síntomas de sufrir la enfermedad, el embarazo deberá derivarse, en función del riesgo, al nivel ya establecido según el Protocolo de seguimiento del embarazo.

El grado de severidad lo determina, especialmente, la cardiopatía.

Diagnóstico en **recién nacidos**: entre el 60 % y el 90 % no presentan clínica y, por lo tanto, la atención neonatal debe ser habitual. Se realizarán pruebas diagnósticas:

- **Microstrout**: Se obtiene una muestra de sangre en un tubo capilar, centrifugar y observar al microscopio la interfase entre el plasma y los glóbulos rojos (la capa leucocitaria) buscando la presencia de tripomastigotes en movimiento. Otra alternativa es realizar un extendido para tinción con coloración con *Romanosky*. Se puede extraer de cualquier parte excepto del cordón umbilical, para no confundir con la sangre de la madre. Si es positivo, deberá iniciarse el tratamiento. La técnica es una de las más sensibles por lo que está siendo ampliamente utilizada para diagnosticar casos de Chagas congénito.
- Pruebas serológicas: puede ser **ELISA** pero se realiza a los 9 meses de vida para evitar la presencia de anticuerpos de origen materno. En el caso de serología positiva, debe tratarse la infección por *T. cruzi*.

El tratamiento debe empezarse en cualquiera de los siguientes casos:

- Neonatos con síntomas clínicos de la enfermedad
- Examen parasitológico o microhematocrito positivo
- Serología positiva a los 9 meses de vida.

El seguimiento de los niños en los que se ha iniciado el tratamiento incluye analíticas de control a la segunda semana de tratamiento y cada 4 semanas mientras que dure el tratamiento o en cualquier caso que aparezcan síntomas. Las serologías deben repetirse de forma anual hasta su negativización.

En los casos en los que no se haya iniciado el tratamiento del recién nacido, el pediatra del centro debería realizar el seguimiento, que incluirá la serología de los 9 meses. Si sale negativa se puede dar el alta al paciente.

5. 4. DIFERENCIAS ENTRE AISLAMIENTOS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* POR PCR

Se han descrito 6 unidades discretas de tipificación (DTU) en función de las características genéticas y su origen (vectores, mamíferos, etc). Los DTU son agrupamientos de aislados o cepas del parásito que tienen un determinado genotipo y características biológicas, epidemiológicas o clínicas similares que se asocian a

determinados tipos de enfermedad. Es decir, debemos tener en cuenta que hay diversidades genéticas entre las cepas del parásito. Se denominan Tc y en números romanos:

- TcI ha sido aislada más frecuentemente del ciclo de vida del parásito salvaje
- TcII es la principal línea genética aislada de la sangre de los pacientes de Sudamérica
- TcIV ha sido el último estudiado, implicado recientemente en dos brotes de EC aguda adquirida oralmente en la Amazonia occidental brasileña.

Además, las cepas difieren en las propiedades biológicas y médicas incluyendo virulencia, patogenicidad, resistencia a los medicamentos, respuesta inmune, niveles de parasitemia y tropismo tisular (Pérez-Molina et al., 2015). Por ello, según el estudio realizado por Margioto Teston et al. (2016), la diversidad genética tiene gran impacto en la habilidad de detectar *T. cruzi* con las técnicas de examen en fresco, hemocultivo, PCR y ELISA. Realizaron un estudio con ratones a los que se les habían inoculado las 3 cepas de *T. cruzi* para comparar la reproducibilidad de las técnicas y con qué cepa son más sensibles:

1. Examen en fresco: se han visto variaciones estadísticamente significativas con diferencias en el porcentaje de animales con resultados positivos, siendo TcII > TcIV > TcI. La parasitemia causada fue en diferentes niveles.
2. Hemocultivo: se han visto variaciones estadísticamente significativas, los animales infectados con la cepa TcII fueron los únicos que tenían la prueba positiva.
3. Diagnóstico molecular por PCR convencional: hubo diferencias en los porcentajes de PCR positiva, TcII > TcI > TcIV. El porcentaje varía entre las cepas TcI y TcIV mientras que todos los animales a los que se les había inoculado la cepa TcII, tenían la prueba positiva.
4. Análisis serológico, ELISA: muestran el orden de positividad tal que TcII > TcIV > TcI.

Sin embargo, a pesar de la buena S de los test serológicos, numerosos estudios de la EC ha revelado un elevado porcentaje de ensayos de PCR positivos en individuos serológicamente negativos. Estas pruebas muestran que la PCR es una técnica que debería ser usada en paralelo a test serológicos para el diagnóstico, debido a la capacidad de detectar sujetos seronegativos. Por ello, una buena combinación sería con *High Resolution Melting* (HRM), método que permite una adecuada y congruente discriminación entre los genotipos de *T. cruzi* porque hay diferencias estadísticamente significativas en la temperatura de desnaturalización de cada DTU (Higuera et al., 2013). HRM es un análisis

de alta resolución de fusión, es una técnica de biología molecular basada en el estudio y comparación de curvas de desnaturalización de las cadenas de ADN. A partir de la PCR se amplifica una secuencia de ADN de interés y se le añaden colorantes fluorescentes con el fin de que se intercalen en el ADN, como por ejemplo *SYBR Green*, *SYTO Dye* o *Chromofy*. Este método es capaz de discernir entre pequeñas diferencias secuenciales de fragmentos obtenidos por PCR.

La parasitemia de TcII tiene un porcentaje positivo mayor que en los ratones a los que les habían inoculado las otras dos cepas (TcI y TcIV) en todos los métodos de detección. Puede deberse al periodo de latencia mayor y mayores niveles de parasitemia. El aumento en la detección de TcII con ELISA se relacionaría a que se usan antígenos homólogos; esta es la cepa predominantemente encontrada en sangre humana. Los datos indican que una combinación de los diferentes métodos aumenta la capacidad de detectar infecciones especialmente para TcI. En conclusión, la diversidad de *T. cruzi* debe tenerse en cuenta en el diagnóstico de la EC en el laboratorio.

6. CONCLUSIONES

1. La enfermedad de Chagas es una de las principales patologías importadas en España y de las principales endemias en Latinoamérica.
2. Con el fin de controlar la enfermedad, el primer paso es un buen diagnóstico en las zonas endémicas y no endémicas.
3. Para efectuar el diagnóstico definitivo de la enfermedad de Chagas, no existe una prueba suficientemente sensible y específica para confirmarla. Siempre se requiere la confirmación serológica mediante **dos métodos** que utilicen **Ag distintos**.
4. El diagnóstico idóneo sería combinar el uso de las técnicas lógicas, inmunológicas y moleculares de acuerdo a la fase de la enfermedad que se sospecha y las características del paciente.
5. Se deben tener en cuenta los distintos genotipos según las regiones y los posibles falsos positivos con otros parásitos que dan reacciones cruzadas en las pruebas diagnósticas.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Angheben A, Boix L, Buonfrate D, Gobbi F, Bisoffi Z, Pupella S et al. Chagas disease and transfusion medicine: A perspective from non-endemic countries. *Blood Transfusion*, 2015; 13: 540-550.
- Basso B y Moretti E. El laboratorio en el estudio de la infección chagástica. [Monografía en internet]. Córdoba: enfermedad de Chagas; 2016 [acceso 18 de abril de 2016]. Disponible en <http://enfermedadchagas.com.ar/labdiag.pdf>
- Blasco-Hernández T, García-San Miguel L, Navaza B, Navarro M, Benito A. Knowledge and experiences of Chagas disease in Bolivian women living in Spain: a qualitative study. *Global health action*, 2016; 9: 30201.
- Cobo F. Medicina tropical y parasitología. Enfermedades infecciosas importadas. 2ª ed. Madrid: formación Alcalá; 2006. p 300-301.
- Connors EE, Vinetz JM, Weeks JR, Brouwer KC. A global systematic review of Chagas disease prevalence among migrants. *Acta Tropica*, 2016; 156: 68-78.
- Ferrer E, Lares M, Viettri M, Medina M. Comparación entre técnicas inmunológicas y moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Enfermedades infecciosas microbiología clínica*, 2012; 31 (5): 277-282.
- Ferrer E. Técnicas moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Saber* [revista en internet] 2015 julio-septiembre. [acceso 6 de mayo de 2016]; 27(3). Disponible en: <http://www.ojs.udo.edu.ve/index.php/saber/article/view/1878>
- Herrador Z, Rivas E, Gherasim A, Gómez-Barroso D, García J, Benito A et al. Using hospital discharge database to characterize Chagas disease evolution in Spain: there is a need for a systematic approach towards disease detection and control. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2015; 9 (4): 1-16.
- Higuera SL, Guhl F, Ramírez JD. Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (DTUs) through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. *Parasites & vectors*, 2013; 6: 112.
- Iborra-Bendicho M, Albert-Hernández M, Márquez-Contreras C, Segovia-Hernández M. ARCHITECT Chagas ®: una nueva herramienta diagnóstica en la enfermedad de Chagas. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 2012; 30 (8): 463-465.
- Imaz-Iglesia I, García-San Miguel L, Ayala-Morillas LE, García-Pérez L, González-Enríquez J, Blasco-Hernández T et al. Economic evaluation of Chagas disease screening in Spain. *Acta tropica*, 2015; 148: 77-88.

- Kannen V, de Oliveira EC, Motta BZ, Chaguri AJ, Brunaldi MO, García SB. Trypanosomiasis-Induced megacolon illustrates how myenteric neurons modulate the risk for colon cancer in rats and humans. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2015; 9(4): 1-11.
- Luz JGG, Souto DEP, Machado-AssisGF, de Lana M, Luz RCS, Martins-Filho OA et al. Applicability of a novel immunoassay based on surface plasmon resonance for the diagnosis of Chagas disease. *Clinica Chimica Acta*, 2016; 454: 39–45.
- Manrique-Abril F, Ospina JM, Herrera G, Florez C, Puerta Bula C. Diagnóstico de enfermedad de Chagas en maternas y recién nacidos de Moniquirá y Miraflores, Boyacá, Colombia. *Infectio*, 2013; 17 (1): 28-34.
- Margioto Teston AP, de Abreu AP, Gruendling AP, Bahia MT, Gomes ML, Marqués de Araújo S et al. Differential parasitological, molecular, and serological detection of *Trypanosoma cruzi* I, II, and IV in blood of experimentally infected mice. *Experimental Parasitology*, 2016.
- Márquez E, Crespo M, Mir M, Pérez-Sáez MJ, Quintana S, Barbosa F et al. Chagas' disease and kidney donation. *Nefrología: publicación oficial de la Sociedad Española Nefrología*, 2013; 33 (1): 128-133.
- Murcia L, Carrillero B, Saura D, Iborra MA, Segovia M. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 2013; 31(1): 26-34.
- Pérez-Molina JA, Martínez Pérez A, Norman FF, Monge-Maillo B, López-Vélez R. Old and new challenges in Chagas disease. *The Lancet Infectious Diseases*, 2015; 15 (11): 1347-1356.
- Pueyo Sánchez MJ (coordinadora). Protocolo de cribado y diagnóstico de la enfermedad de Chagas en mujeres embarazadas latinoamericanas y sus bebés. Barcelona: departamento de salud de la Generalitat de Catalunya, 2010.
- Rebollo Fuentes L, Calvo Reyes MC, Pérez de Ayala Balzola A. Utility of the Architect assay as a single assay for the diagnosis of chronic Chagas disease. Departamento de microbiología del Hospital 12 de Octubre, Madrid (España), 2014.
- Roca Saumell C, Soriano-Arandes A, Solsona Díaz L, Gascón Brustenga J. Documento de consenso sobre el abordaje de la enfermedad de Chagas en atención primaria de salud de áreas no endémicas. *Atención Primaria*. 2015; 47 (5): 308-317.

- Santos FLN, de Souza WV, Barros MdS, Nakazawa M, Krieger MA, Gomes YdM. Chronic Chagas disease diagnosis: a comparative performance of comercial enzyme immunoassay tests. American Journal of tropical Medicine and Hygiene, 2016; 94: 1034-1039.
- Tartalini VM, Fontanella GH, Nocito AL, Revelli SS. Estudio preliminar de la miocarditis chagástica aguda experimental y su relación con la administración de esteroides sexuales. [monografía en internet]. Santa Fe: insuficienciacardiaca.org; 2011 [acceso 7 de mayo de 2016]. Disponible en: <http://www.insuficienciacardiaca.org/html/v6n4/body/v6n4a02.htm>
- Teixeira-Carvalho A, Campos FMF, Geiger SM, Rocha RDR, de Araújo FF, Vitelli-Avelar DM, et al. FC-TRIPLEX Chagas/Leish IgG1: A Multiplexed Flow Cytometry Method for Differential Serological Diagnosis of Chagas Disease and Leishmaniasis. PLoS ONE, 2015; 10 (4): e0122938
- Werner AB, Heitmann I, Jercic MI, Jofré L, Muñoz P, Noemí I et al. Comité de parasitología, departamento de enfermedades emergentes y re-emergentes, Ministerio de Salud de Chile. Guías clínicas de la enfermedad de Chagas. Revista chilena de infectología, 2008; 25 (agosto): 379-383.