



LA IMPORTANCIA DEL DIAGNÓSTICO

de la *Tripanosomiasis Americana* o
enfermedad de Chagas.

M. en C. Ignacio Martínez Martínez y Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez.

Laboratorio de estudios sobre la Tripanosomiasis Americana, Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM. México, D.F.
imm@biomedicas.unam.mx; besgu@biomedicas.unam.mx

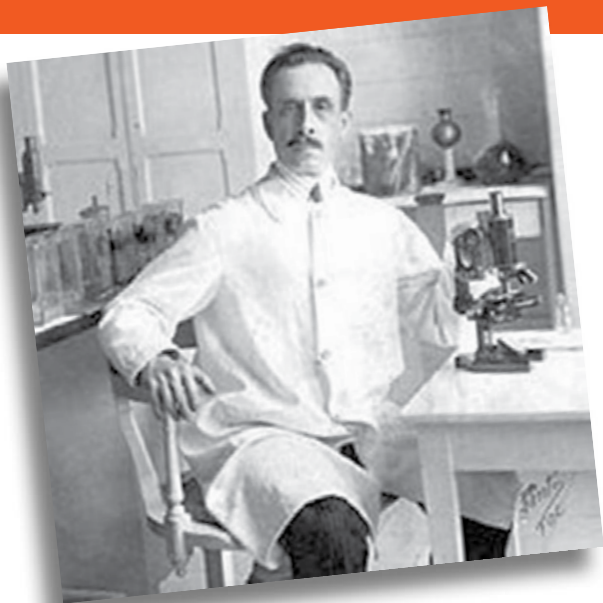
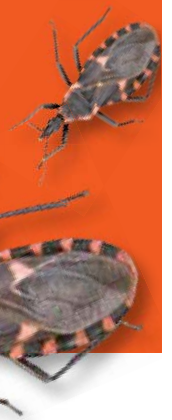
Enfermedad de Chagas y ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana, es una enfermedad causada por el protozooario homoflagelado *Trypanosoma cruzi*, el cual es transmitido a diferentes mamíferos, incluido el hombre, por varias especies de insectos hematófagos, pertenecientes al orden Reduviidae, subfamilia Triatominae, conocidos también como chinches hociconas.

Este padecimiento lleva el nombre de su descubridor, el brasileño Carlos Chagas, quién en 1909, describió no sólo la enfermedad, sino también al agente causal, el vector involucrado y las manifestaciones clínicas. Gracias a sus trabajos, y a los de sus discípulos, se pudo conocer el ciclo de vida del parásito y la forma en que el humano se convierte en su hospedero.

Durante el ciclo natural de la infección, el insecto vector se alimenta de la sangre de un mamífero infectado, ingiriendo el estadio de tripomastigote sanguíneo. Dentro de la chinche, y a lo largo del tracto digestivo de esta, el parásito sufre una serie

de cambios morfológicos hasta transformarse en epimastigote, la cual corresponde a su forma replicativa dentro del vector. Posteriormente, algunos de los epimastigotes alcanzarán la porción final del tracto digestivo (intestino posterior) del insecto en donde, nuevamente, sufrirán cambios morfológicos para convertirse en tripomastigotes metacíclicos, que son las formas infectivas. Cuando el vector infectado se alimenta de otro mamífero, el insecto defeca, depositando tripomastigotes metacíclicos con sus heces y orina. Los parásitos ingresan al nuevo hospedero a través de lesiones en la piel, causadas por el propio hospedero al rascarse o a través de las mucosas. Una vez dentro, los tripomastigotes pueden infectar diversos tipos celulares. Dentro de las células, los parásitos se redondean para formar amastigotes, multiplicándose intracelularmente por fisión binaria. La célula infectada es lisada y los parásitos son liberados transformándose nuevamente en tripomastigotes, los cuales pueden infectar células adyacentes o alcanzar el torrente sanguíneo para llegar a diversos órganos. Durante su tránsito por el sistema circulatorio, los parásitos pueden ser tomados por un vector no infectado al alimentarse y, de esta forma, se inicia nuevamente el ciclo.



Fotografía de Carlos Chagas, quién en 1909 describió la enfermedad que lleva su nombre. También describió al agente causal, el vector transmisor y los reservorios mamíferos que participan en el ciclo de vida de *T. cruzi*.
Tomada de http://en.wikipedia.org/wiki/Carlos_Chagas.

El principal medio de transmisión del parásito es a través de las heces de vectores infectados (80 a 90% de los casos). El segundo medio se debe a transfusión sanguínea (5 a 20 %). La transmisión congénita, la vía oral y los accidentes de laboratorio son menos frecuentes (0.5 a 8 %), pero ocurren.

Fases de la enfermedad

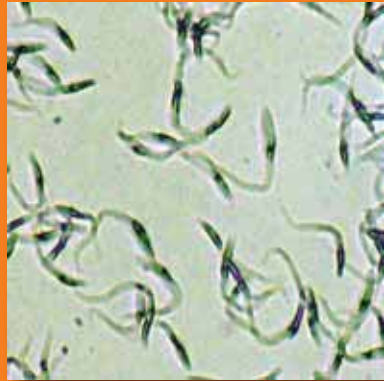
El cuadro clínico de la enfermedad se ha dividido en dos etapas principales: la fase aguda, que es de corta duración y la fase crónica, que se presenta a largo plazo. La fase crónica presenta dos formas distintas: crónica indeterminada (o fase asintomática) y crónica sintomática.

La fase aguda de la enfermedad se presenta inmediatamente después de la entrada del parásito al organismo. Ésta es de corta duración y, en la mayoría de los casos, asintomática. Ocasionalmente puede ir acompañada de una inflamación localizada (chagoma) en el sitio de entrada del parásito. Si la entrada del parásito es por el tejido conjuntivo del ojo, puede presentarse edema bupalpebral unilateral (Signo de Romaña-Mazza), el cual desaparece en 15 días aproximadamente. También pueden presentarse manifestaciones clínicas cuyos síntomas pueden pasar inadvertidos o ser confundidos con otros

Palabras clave:
T. cruzi, Chagas, Diagnóstico.

padecimientos. La característica más importante es la presencia de parásitos circulantes en sangre (parasitemia), lo cual permite que se diagnostique la infección por métodos parasitológicos, los cuales se describirán posteriormente.

Fotografía de epimastigotes de *T. cruzi* en cultivo. Tinción con Giemsa, 400x. Fotografía proporcionada por Martínez-Velazco María Luisa (Laboratorio de estudios sobre Tripanosomiasis Americana, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM).



La fase crónica indeterminada (asintomática) se caracteriza por la ausencia de signos y síntomas, por lo cual los individuos infectados parecen sanos. Sin embargo, los parásitos se multiplican lentamente dentro de las células de los tejidos infectados. Este periodo es variable y puede abarcar desde algunos meses hasta varios años. En esta condición, los individuos presentan electrocardiogramas normales y la única manera en que puede determinarse la presencia de infección es por medio de pruebas serológicas. Se estima que sólo el 30-35 % de los individuos que cursan la fase indeterminada evolucionarán hacia la fase crónica sintomática.

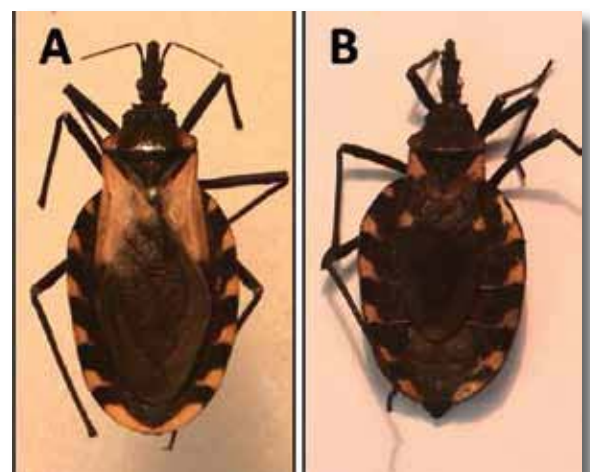
La fase crónica sintomática puede aparecer varios años después de la fase aguda. Se caracteriza por un número reducido de parásitos en circulación, pero con un nivel elevado de anticuerpos anti-*T. cruzi*. Pueden manifestarse disnea, palpitaciones, dolor en el pecho e insuficiencia cardíaca. En algunos casos, puede presentarse muerte súbita en individuos sin síntomas importantes previos. La severidad de esta fase depende de diversos factores, tales como las características del parásito infectante y la susceptibilidad del hospedero, la cual depende de su fondo genético, capacidad de respuesta inmune y estado nutricional. Los individuos con enfermedad de Chagas crónica, suelen presentar principalmente daño en tejido cardíaco, que se evidencia por estudios electro cardiográficos o radiológicos, en los que se observa incremento en el tamaño del corazón (cardiomegalia), insuficiencia cardíaca y/o alteraciones electro cardiográficas, tales como bloqueos completos de rama derecha del haz de His (BCRDHH) o bloqueos incompletos (BIRDHH). Lesiones en esófago, colon y sistema nervioso periférico son menos frecuentes, pero también pueden presentarse.

Epidemiología

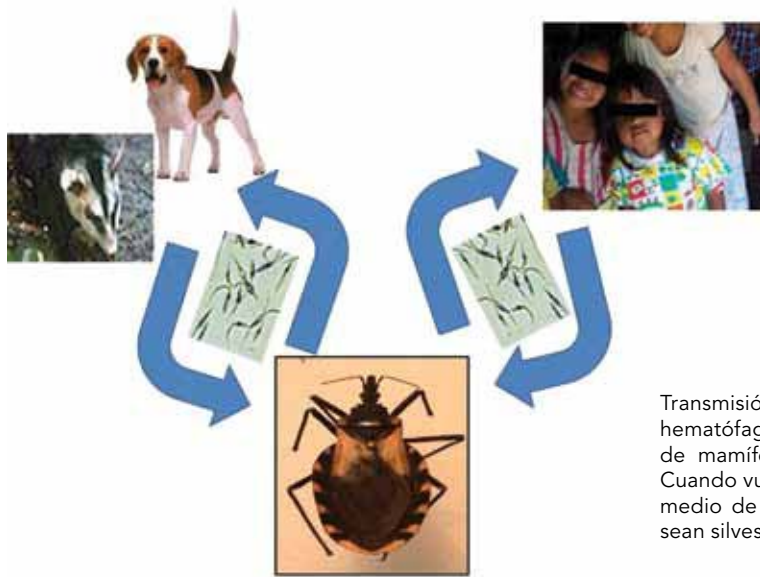
La infección con *T. cruzi* es un problema de salud emergente en México y es reconocido como problema de salud pública en gran parte de Centro y Sudamérica, donde se estima que hay de 16 a 18 millones de individuos infectados. La morbilidad y mortalidad reportada para los diferentes países de América varía en relación a múltiples factores, como la convivencia con el vector transmisor, la heterogeneidad genética de las cepas de *T. cruzi* y el fondo genético del hospedero. Se considera que únicamente la mitad de los individuos infectados presentará en algún momento manifestaciones de la enfermedad, y que de éstos, un 50% morirá por causas relacionadas con la etapa crónica de la misma.

Si bien este padecimiento es endémico del continente Americano, donde está distribuido desde el sur de Estados Unidos hasta el sur de Argentina y Chile, recientemente se ha convertido en un problema de salud emergente en países como Estados Unidos, Canadá, Francia, Italia, Suiza, Dinamarca, España, Japón y Alemania. En estos países, la presencia de inmigrantes americanos portadores de la infección y su papel como donadores en bancos de sangre, constituye un riesgo latente para la diseminación de la infección.

En México, se han reportado vectores infectados y casos de infección humana en toda la extensión geográfica. Sin embargo, el número de casos reportados es más alto en el centro y sur de la República Mexicana. En los estados del norte de México, el número de casos reportados es escaso, pero ello puede deberse a la falta de estudios encaminados a la detección de la infección.



Vectores de *T. cruzi* presentes en México. A) *Triatoma pallidipennis*, B) *Triatoma longipennis*. Fotografías proporcionadas por Martínez Martínez I. (Laboratorio de estudios sobre Tripanosomiasis Americana, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM).



Transmisión de *T. cruzi*. Los vectores, por sus hábitos hematófagos, pueden tomar al parásito en la sangre de mamíferos silvestres y domésticos infectados. Cuando vuelven a alimentarse, pueden infectar por medio de sus heces y orina a otros mamíferos, ya sean silvestres o domésticos y al hombre.



Tratamiento de la enfermedad

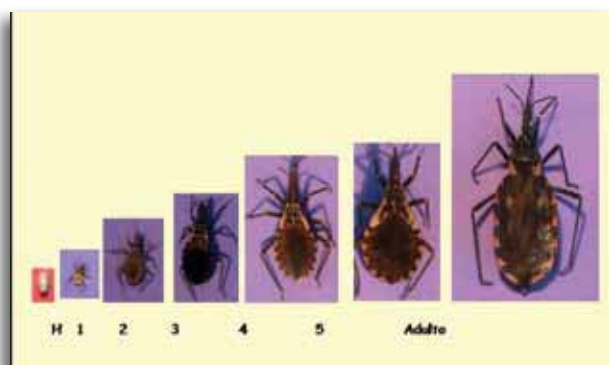
Desde principios de 1970 se comenzaron a usar dos compuestos, Nifurtimox y Benznidazol, los cuales se han mantenido hasta la fecha como opciones de tratamiento para la tripanosomiasis americana.

El Nifurtimox es un 5-nitrofurano (3-metil-4-(5-nitrofurfurilideneamina) tetrahydro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido) cuyo número de acceso en la compañía Bayer es 2502, comercializado con el nombre de Lampit. El mecanismo de acción de este compuesto involucra la generación de radicales nitroanión por nitroreductasas, que en la presencia de oxígeno conducen a intermediarios reactivos de éste. Estos radicales libres interactúan con las macromoléculas, conduciendo a daño celular como peroxidación de lípidos, destrucción de membrana, daño a ADN e inactivación de enzimas. Desafortunadamente, los efectos señalados pueden presentarse tanto en *T. cruzi*, como en las células del hospedero, por lo que pueden presentarse consecuencias colaterales como anorexia, pérdida de peso, trastornos del sueño, náusea, vómito y, ocasionalmente, diarrea y cólico intestinal.

Benznidazol es un 2-nitroimidazol (N-benzyl-2-nitroimidazole acetamide) cuyo número de producto en la farmacéutica Roche es RO7-1051. El nombre comercial es Rochagan en Brasil y Radanil en Argentina. Si bien no se ha definido con detalle el mecanismo de acción de este fármaco, se sabe que puede unirse directamente a ciertas biomoléculas como ADN, lípidos y, preferentemente, ARN. Al igual que

el nifurtimox, este fármaco puede generar trastornos secundarios como dermatitis, erupciones cutáneas, edema, linfadenopatía y dolores musculares y de articulaciones, disminución de la producción de células en médula ósea y agranulocitosis, polineuropatía, parestesia y polineuritis de nervios periféricos.

No obstante las reacciones secundarias observadas con ambos fármacos, actualmente son las únicas alternativas terapéuticas disponibles, por lo que su administración requiere un seguimiento estricto por parte de un médico especialista.



Ciclo de vida de *Triatoma phyllosoma*, vector de *T. cruzi* en México. El insecto nace de un huevo (H), pasa por cinco estadios ninfales (1-5) hasta llegar a ser adulto. Tanto las ninfas como los adultos se han encontrado infectados con *T. cruzi*, por lo que todos ellos son potenciales transmisores del parásito. Fotografía proporcionada por Martínez Martínez I. (Laboratorio de estudios sobre Tripanosomiasis Americana, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM).

Diagnóstico

Para el diagnóstico de la infección con *T. cruzi* se cuenta con una serie de métodos que pueden detectar directamente al parásito, o bien, indirectamente a través de los anticuerpos que se generan como resultado de la infección con el mismo. En términos generales, dichos métodos pueden incluirse en tres grupos principales: parasitológicos, moleculares y serológicos.

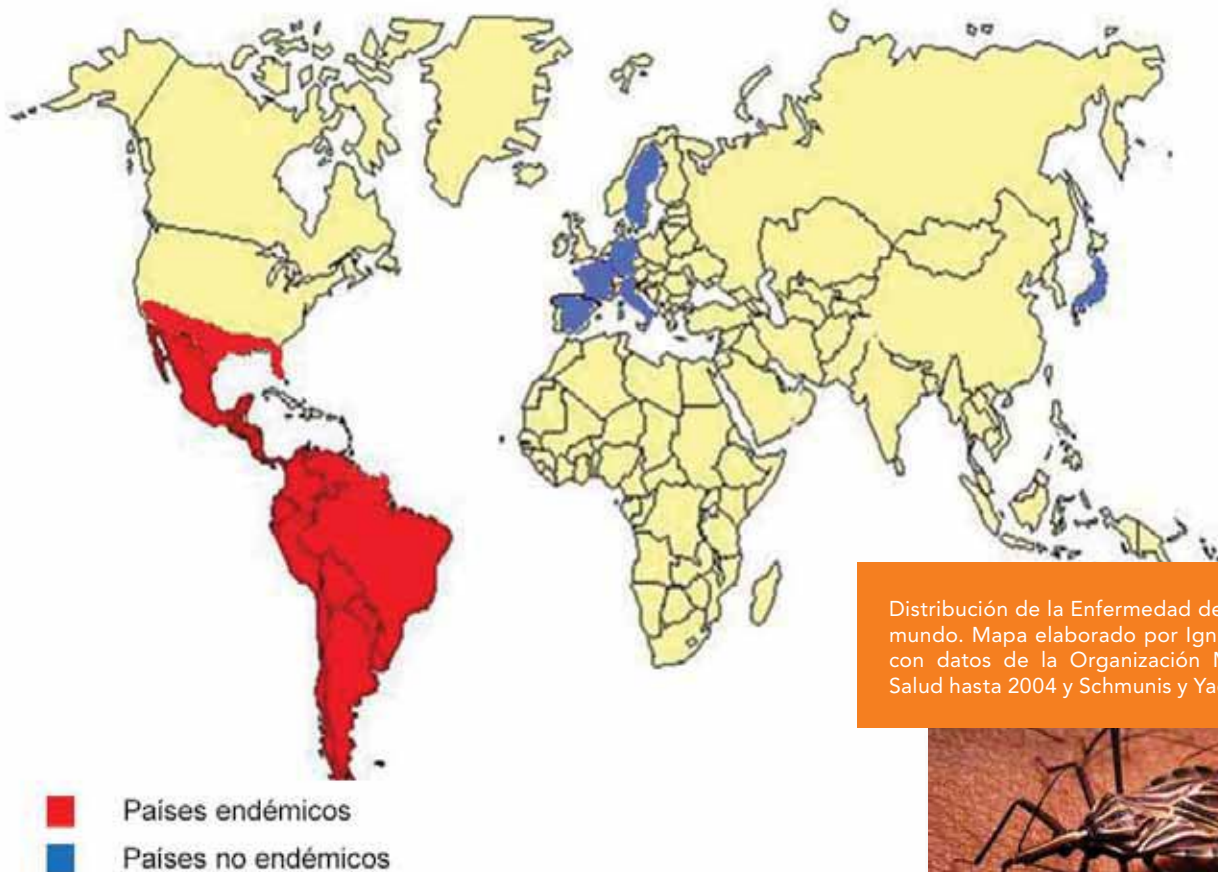
El diagnóstico parasitológico se emplea con alta sensibilidad en la fase aguda, ya que puede detectarse la presencia del parásito en circulación; sin embargo, en la fase crónica, la sensibilidad baja hasta aproximadamente 40%, debido a la escasa parasitemia.

Para realizar esta clase de diagnóstico puede realizarse un frotis de sangre para observar en fresco

al microscopio. También puede realizarse hemocultivo del parásito en medios de cultivo apropiados. Este último procedimiento ofrece la ventaja de permitir la obtención de aislados, que pueden caracterizarse posteriormente por ensayos biológicos o genéticos.

Otra forma de diagnóstico parasitológico es el xenodiagnóstico, el cual consiste en alimentar a un vector no infectado con la sangre de una persona con probable infección y revisar las heces después de algún tiempo con el fin de encontrar los parásitos en las mismas. Este método es cada vez menos utilizado por varias razones, entre las que se incluyen: comúnmente se requiere utilizar un número grande de vectores, una infraestructura particular para mantener las colonias de los vectores que se emplean en dicha técnica y los casos agudos, en los cuales se emplea con éxito, son escasos.

Enfermedad de Chagas



Distribución de la Enfermedad de Chagas en el mundo. Mapa elaborado por Ignacio Martínez, con datos de la Organización Mundial de la Salud hasta 2004 y Schmunis y Yadon, 2009.



Por otro lado, el diagnóstico molecular de la infección por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), se ha explorado desde hace algunos años. Este procedimiento consiste en tomar una muestra de sangre del sujeto sospechoso de estar infectado y realizar una extracción de ADN total. Este material es empleado para realizar PCR empleando iniciadores específicos para el parásito. Los productos de amplificación obtenidos se corren en geles de agarosa y se comparan con controles positivos y negativos.

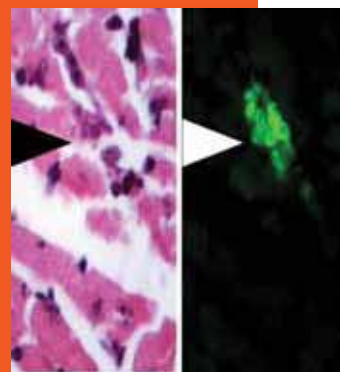
Si bien este procedimiento tiene una alta sensibilidad (hasta 1 parásito en 20 ml de sangre), aún no se emplea con fines de diagnóstico masivo, principalmente por los altos costos de los reactivos empleados y porque se requiere que el parásito esté presente en la sangre del individuo en el momento de tomar la muestra, lo cual en la mayoría de los casos indeterminados, no ocurre.

Los métodos de diagnóstico serológico son los más empleados para evaluar el curso de la infección más allá de la fase aguda o para detectarla por primera vez en casos indeterminados o asintomáticos. Dichos métodos sirven para determinar la presencia de anticuerpos (IgG, IgM, IgA) específicos contra *T. cruzi*. El procedimiento es sencillo, pues sólo se requiere suero del sujeto, el cual se hace reaccionar contra moléculas del parásito para capturar los anticuerpos específicos, los cuales son revelados posteriormente por un anticuerpo secundario acoplado a un sistema enzimático como fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano.

Los métodos para el serodiagnóstico de la infección con *T. cruzi* son los siguientes:

- Ensayo inmunoenzimático (ELISA, por sus siglas en inglés), en el cual se emplean placas de plástico sensibilizadas con antígenos de *T. cruzi*, los cuales se retan frente a los sueros problema y se revela la presencia de inmunoglobulinas por medio de un anticuerpo secundario acoplado a una enzima. Al adicionar el sustrato de la enzima en presencia de una molécula reportera, se obtiene un compuesto colorido, cuya absorbancia será mayor cuanto más abundante sea la cantidad de anticuerpos contra el parásito presentes en la muestra evaluada. Un ejemplo de ello es el sistema de peroxidasa de rábano la cual, en presencia de peróxido de hidrógeno, orto-fenilendiamina y ácido sulfúrico, da un producto cuya absorbancia puede leerse a 490 nanómetros.

Parásitos de *T. cruzi* en tejido muscular. Corte de músculo esquelético teñido con Hematoxilina-eosina (A), donde se señala un nido de amastigotes (flecha negra), la forma intracelular del parásito. Cuando el mismo corte es incubado con un anticuerpo fluorescente específico para *T. cruzi*, los parásitos pueden observarse de color verde (flecha blanca). Fotografías proporcionadas por Vizcaino Castillo Andrea (Laboratorio de estudios sobre Tripanosomiasis Americana, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM).



- Inmunofluorescencia Indirecta. Para esta técnica, se fijan parásitos sobre portaobjetos de vidrio, los cuales son incubados en presencia de los sueros control y problema, diluidos. Si hay anticuerpos anti-*T. cruzi* en la muestra evaluada, éstos se quedarán unidos a los parásitos fijados y podrán ser reconocidos por un anticuerpo secundario acoplado a una molécula fluorescente. La reacción positiva debe determinarse con la ayuda de un microscopio de fluorescencia.

- Hemaglutinación indirecta. Antígenos obtenidos del parásito son empleados para sensibilizar glóbulos rojos, los cuales pueden entonces ser aglutinados por los anticuerpos específicos presentes en una muestra evaluada. La dilución del suero en la cual se obtiene la aglutinación es comparada con la empleada usando controles positivos y negativos.

- Western Blot (WB). En esta técnica los antígenos del parásito son electrotransferidos a tiras de nitrocelulosa, las cuales son incubadas frente a los sueros evaluados. Un anticuerpo secundario es empleado para obtener una reacción colorida como en la técnica de ELISA.

MAL DE CHAGAS; LA MUERTE SILENCIOSA

**TRAS 15 AÑOS SIN MOLESTIAS,
PUEDE DEVENIR LA MUERTE.**

La diferencia radica en que en este sistema lo que se obtiene generalmente son depósitos del revelador en los lugares donde se reconocieron antígenos del parásito. Estos depósitos aparecen como bandas coloridas en lugares específicos de la membrana.

Los antígenos empleados en las técnicas descritas anteriormente pueden ser de diferentes naturalezas: totales, purificados, productos de excreción-secreción o de superficie, así como antígenos recombinantes.



Western Blot de sueros positivos a *T. cruzi* (carriles 3-9). Se incluye control positivo (carril 1) y control negativo (carril 2). Las bandas de color oscuro indican antígenos del parásito, reconocidos por anticuerpos específicos, presentes en los sueros evaluados. Fotografía proporcionada por Martínez Martínez I. (Laboratorio de estudios sobre Tripanosomiasis Americana, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM).

El diagnóstico serológico de la infección con *T. cruzi* ha cobrado relevancia desde que se han reportado casos de individuos infectados en bancos de sangre. Actualmente, se cree que esta forma de transmisión es la más importante en las grandes urbes, donde el vector no está presente, pero si los inmigrantes de zonas endémicas que pueden acudir a donar sangre potencialmente infectada.

En México, la norma oficial mexicana (NOM-003-SSA2-1993) establece que los bancos de sangre deben aplicar al menos dos pruebas de diagnóstico para *T. cruzi* a las muestras de sangre de individuos procedentes de zonas endémicas. Este criterio aplica en todos los bancos de sangre del territorio nacional. Los datos existentes hasta 1998, mostraban que la prevalencia de infección con *T. cruzi* en muestras de sangre de todo el país estaba en un rango de 0.2 a 2.8%. Sin embargo, se tienen reportes de localidades con seroprevalencias de hasta 32%.

Laboratorio de Tripanosomiasis americana: 10 años de experiencia en diagnóstico.

En nuestro laboratorio de estudios sobre Tripanosomiasis Americana, del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, desde finales de los años 90, se han desarrollado un par de técnicas para el diagnóstico de la infección con *T. cruzi*. Las pruebas estandarizadas son ELISA y WB, en las cuales se emplea antígeno de cepas mexicanas del parásito. Estas dos técnicas han demostrado tener alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la infección. Ambas pruebas fueron empleadas inicialmente en un estudio de campo en población abierta del estado de Morelos, México. El resultado de ese estudio mostró una seroprevalencia del 20% en algunas comunidades del estado.

Con estas mismas pruebas se ha dado apoyo a diferentes instituciones del sector salud en México, ya sea haciendo diagnóstico primario o como pruebas confirmatorias. Nuestras colaboraciones incluyen al Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", la Universidad Autónoma del Estado de Guerrero, el Centro de Estudios sobre Enfermedades Infecciosas en Campeche, el Centro Médico Nacional "La Raza" del IMSS y, recientemente, el Hospital General "Dr. Manuel Gea González". Además del diagnóstico, el interés de nuestro grupo de trabajo es la identificación de antígenos del parásito que sirvan como marcadores de progresión de la enfermedad. Hasta ahora, hemos identificado algunas moléculas candidatas para tal fin. Asimismo, hemos estudiado la respuesta inmune contra los principales antígenos del parásito.

Las dos pruebas que empleamos para el diagnóstico han sido validadas con laboratorios de referencia en Sudamérica, obteniendo altos valores de correlación, con lo cual queda demostrada su utilidad como herramientas en el diagnóstico de esta infección en nuestro país. Adicionalmente, estamos trabajando en el desarrollo de un método de diagnóstico rápido, barato y sensible que nos permita evaluar un amplio número de muestras a bajo costo, para ofrecerlo a las instituciones de salud en México.

Los resultados de nuestros trabajos en el área de diagnóstico han sido presentados ante especialistas en diversos foros. Los más recientes fueron el XXVII Congreso Nacional de Bioquímica (2008), el XVIII Congreso Nacional de Parasitología (2009), el XXV Congreso Nacional de Investigación Biomédica (2009), y la reunión por el centenario del descubrimiento de la enfermedad de Chagas (2009).

Finalmente, en colaboración con el Instituto de Cardiología "Ignacio Chávez" y con el Centro Universitario del Sur de Jalisco, de la Universidad de Guadalajara hemos estandarizado estas mismas pruebas pero encaminadas a la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* en perros, los cuales son reservorios domésticos de la infección y que juegan un papel muy importante en mantener la infección en los ambientes doméstico y peridoméstico. Con ello, esperamos tener un panorama más amplio sobre el estado de la infección en humanos y en reservorios domésticos, lo cual será de enorme importancia para determinar con mayor precisión la magnitud de la infección en zonas urbanas y rurales.

Bibliografía Recomendada

- Chapadeiro E. Clinical evolution and morbidity in Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999; 94 (suppl I): 309-310.
- Espinoza, B, et. al. Genotype and virulence correlation within mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* isolated from patients. Acta Trop 1998; 70(1): 63-72.
- Guzman-Bracho C, et al. Riesgo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* por transfusión de sangre en México. Rev Panam Salud Pública 1998; 4(2): 94-99.
- Lopez-Olmos V, et. al. Biological characterization and genetic diversity of mexican isolates of *Trypanosoma cruzi*. Acta Trop 1998; 69(3): 239-254.
- Luquetti A, et al. Performance levels of four latin american laboratories for the serodiagnosis of Chagas disease in mexican sera samples. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104(5): 797-800.
- Martínez I, et al. Correlación entre diagnóstico serológico y molecular de la infección con *Trypanosoma cruzi* en un estudio en el estado de Guerrero, México. Memorias del Centenario del descubrimiento de la enfermedad de Chagas 2009: 103-105.
- Martínez I, et al. Anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* en donadores de banco de sangre, Centro Médico Nacional La Raza, IMSS. Memorias del XVIII Congreso Nacional de Parasitología 2009. Resumen JC-38, pág. 179.
- Momen H. Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a commentary on characterization and nomenclature. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999; 94 (Suppl 1): 181-184.
- Rangel Flores H, et al. Serologic and parasitologic demonstration of *Trypanosoma cruzi* infections in an urban area of central Mexico: correlation with electrocardiographic alterations. Am J Trop Med Hyg 2001; 65(6): 887-895.
- Sánchez B, et al. Standardization of micro-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and western blot for detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies using extracts from mexican strains as antigens. Arch Med Res 2001; 32(5): 382-388.
- Schmunis GA y Yadon ZE. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. Acta Trop 2010; doi:10.1016/j.actatropica.2009.11.003
- World Health Organization. Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee. Technical Report Series 905, 2002. Geneva. ISBN 92 4 120905 4.

