



DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.

Cristina Riera.

Laboratorio de Parasitología. Facultad de Farmacia, Universitat de Barcelona.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es una infección parasitaria causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*. Está ampliamente distribuida en América Central y del Sur donde es endémica. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que la población de riesgo es de aproximadamente 60 millones de personas, entre 9 y 12 millones están infectados y cada año provoca 12 500 muertes. La enfermedad de Chagas está incluida dentro de las denominadas "Enfermedades Olvidadas".

La transmisión en área endémica es a través de insectos hematófagos de la familia Reduviidae, los triatomíneos, conocidos vulgarmente en área endémica como "vinchucas", vectores de la enfermedad y que transmiten cuando defecan sobre la piel o mucosas al picar para alimentarse. El parásito, presente en las heces de los triatomíneos, penetra activamente en el hospedador a través de las lesiones en la piel o de las mucosas producidas por la picada del vector, cuando el individuo se toca o rasca la picadura. El Chagas también puede transmitirse por otras vías que no son la vectorial. En zonas endémicas, y especialmente en áreas no endémicas, estas otras vías de transmisión han ido tomando protagonismo como la transmisión vertical de madre a hijo, que se calcula que tiene una tasa de transmisión entre un 4 y 7 % y la transmisión a través de transfusión de sangre infectada y sus componentes. Con menos frecuencia se produce la transmisión a través del trasplante de órganos, la transmisión oral por alimentos contaminados por el parásito y hay descritos casos a través de accidentes de laboratorio.

FORMAS EVOLUTIVAS DEL PARÁSITO

Trypanosoma cruzi es un protozoo flagelado que pertenece a la familia de los Kinetoplastidae, todos sus miembros se caracterizan por la presencia de una mitocondria de gran tamaño denominada kinetoplasto. El parásito presenta 3 formas evolutivas: la tripomastigota presente sólo en sangre, la epimastigotes forma de multiplicación en el vector y en los cultivo *in vitro* y la forma amastigota forma no flagelada de multiplicación intracelular.



Figura 1. Formas evolutivas de *T. cruzi*. A) amastigota, B) epimastigota C) tripomastigota.

MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y FASES DE LA ENFERMEDAD

En hombre la infección por *T. cruzi* presenta dos fases bien diferenciadas: la fase aguda que dura de 4 a 8 semanas y la fase crónica que persiste por el resto de la vida.

La fase aguda o primoinfección se presenta 1 - 2 semanas después de la infección. En la mayoría de los casos es asintomática pero en algunos sujetos se presentan síntomas leves e inespecíficos. En el caso de que se presenten síntomas puede cursar con un nódulo cutáneo local que recibe el nombre de chagoma y tiene lugar en el lugar de inoculación del triatomino vector. Cuando esto ocurre en la membrana de la mucosa conjuntival, el paciente puede desarrollar edema periorbital, unilateral, conjuntivitis y linfadenitis periauricular que se conoce como signo de Romaña. En otras ocasiones se puede producir fiebre prolongada, mal estado general, hepatoesplenomegalia, linfadenopatía, miocarditis, encefalitis. En un 5 -10 % de los casos sintomáticos se puede producir la muerte.

La infección congénita puede considerarse una forma de fase aguda de la enfermedad y suele pasar inadvertida. En los casos sintomáticos puede presentarse fiebre, hepatoesplenomegalia y anemia.

La fase crónica aparece después de la fase aguda, clínicamente es asintomática y puede permanecer latente durante décadas o durante toda la vida del paciente en un 60 - 70 % de los casos (forma indeterminada). En esta fase los parásitos permanecen ocultos y se multiplican principalmente en células de la musculatura cardíaca y digestiva como forma amastigota. La infección se puede reactivar con otra enfermedad grave o en condiciones de inmunosupresión severa por trasplante de órganos o SIDA.

En un 30 - 40 % de los pacientes, entre 10 y 30 años tras la exposición, pueden aparecer síntomas de la enfermedad de Chagas, siendo las alteraciones más habituales la cardiopatía y la alteración gastrointestinal (megacolon y megaesófago). De estos casos un 10 - 30 % de los pacientes

presentan afectación cardíaca y entre un 5 y 10 % afectación digestiva. También se pueden presentar alteraciones neurológicas (demencia) y con el paso de los años la infección puede causar la muerte súbita o insuficiencia cardíaca por destrucción progresiva del músculo cardíaco.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Las técnicas diagnósticas están encaminadas a detectar el parásito o bien a detectar la respuesta inmune que se genera. El criterio para utilizar uno u otro test diagnóstico se basa en el conocimiento o sospecha respecto a que fase de la infección presenta el paciente.

Durante la fase aguda los parásitos circulantes son abundantes y los métodos parasitológicos son los más adecuados para detectar la presencia de *T. cruzi* en muestras de sangre. Durante la fase crónica las parasitemias son bajas e intermitentes y se detectan altos niveles de IgG específicas por lo que el diagnóstico de laboratorio se basará en la determinación de anticuerpos aplicando diferentes técnicas serológicas.

MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA LA FASE AGUDA

La aplicación de métodos parasitológicos directos nos permiten realizar el diagnóstico basándonos en la observación e identificación morfológica de las formas tripomastigotas presentes en sangre.

a) Métodos directos sin concentración previa

En el examen en fresco, los parásitos se deben buscar en sangre periférica, entre portaobjeto y cubreobjeto, examinando la preparación inmediatamente antes de que se seque la gota de sangre. Para obtener una monocapa de hematíes, que permita observar al microscopio a 400 aumentos el movimiento de las formas parasitarias, se recomienda colocar unos 5 µL de sangre en el centro de la preparación. Si se visualiza el parásito se confirma el diagnóstico y no es necesario hacer otros exámenes.

Otras opciones para el diagnóstico directo son el frotis o la gota gruesa a partir de sangre, mejor sin anticoagulantes, y que posteriormente teñiremos con el colorante de Giemsa y observaremos al microscopio a 400 o 1000 aumentos (Figura 2). La forma tripomastigota es extracelular, mide entre 16 - 20 µm de largo y suele adoptar forma de C o S. Se caracterizan por la presencia de un kinetoplasto muy grande, que parece que ultrapase los márgenes del parásito en su parte extrema y por el aspecto poco replegado de la membrana ondulante que acaba en un flagelo libre. Estas formas no deben ser confundidas con *T. rangeli*, otro tripanosoma no patógeno para el hombre y que puede estar presente en la sangre de pacientes de área endémica. Sus formas tripomastigotas se diferencian de *T. cruzi* por ser más grandes, kinetoplasto pequeño y membrana ondulante visible (Figura 3).

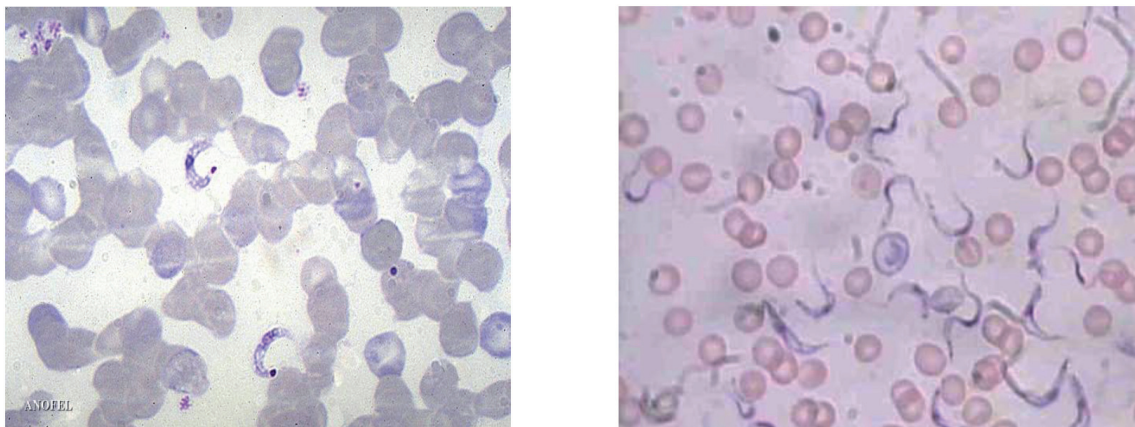


Figura 2. Formas tripomastigotas en forma de C (A y B) y S (B) en un frotis de sangre teñido con el colorante de Giemsa (1000 aumentos).

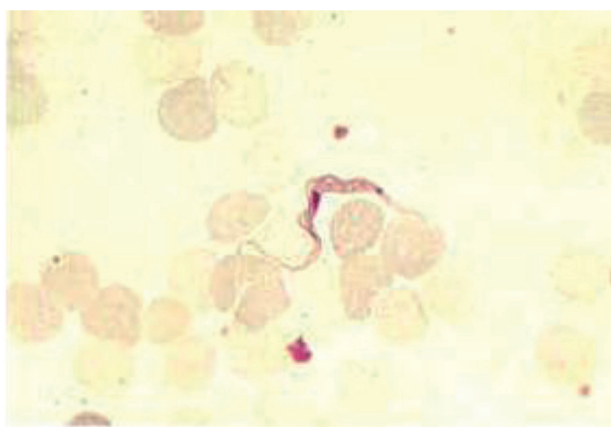


Figura 3. Forma tripomastigota de *T. rangeli* (30 μ m) a 1000 aumentos.

b) Métodos directos de concentración

En muchas ocasiones las formas parásitas en sangre son escasas y difíciles de visualizar y debemos utilizar técnicas de concentración para poderlas observar. Estas técnicas mejoran el rendimiento de la microscopía convencional a partir de sangre total. Las más utilizadas son el microhematocrito y la técnica de Strout. En área endémica la sensibilidad de estos dos métodos oscila entre un 85 - 100 %.

c) Microhematocrito

Es una técnica que se considera de elección para el diagnóstico de la infección congénita, cuando se dispone de poca cantidad de sangre. Se recoge la sangre, aproximadamente 50 μ L, en tubos capilares heparinizados o de microhematocrito (de 4 a 6 capilares). Se centrifuga en la microcentrífuga y se observa al microscopio. En la interfase entre los hematíes y el plasma se encuentra la capa leucocitaria en la que se pueden observar los movimientos de los parásitos a 400 aumentos. Si la sangre no puede ser procesada rápidamente, se puede recoger con heparina entre 2 y 5 mL y se debe efectuar la lectura antes de las 24 horas de la extracción. Si la observación la realiza personal experto la sensibilidad puede ser de un 85 %.

d) Prueba de Strout

El método consiste en concentrar los parásitos a partir de 3 mL de sangre recogida sin anticoagulante y dejando el tubo a 37 °C durante dos horas para que se retraiga el coágulo. Si hay parásitos migrarán hacia fuera del coágulo. Se transfiere el suero a otro tubo y tras varios ciclos de centrifugación realizamos una observación del sedimento en fresco o bien después de realizar un frotis y teñirlo con Giemsa. Al igual que para el microhematocrito la sangre debe ser reciente y observada dentro de las 4 - 8 horas posteriores a su obtención. Puede ser conservada en nevera a 4 °C o bien a temperatura ambiente hasta ser procesada.

METODOS DIAGNÓSTICOS PARA LA FASE CRONICA

Cuando las parasitemias son bajas e intermitentes, característica de la fase crónica, debemos recurrir a detectar la presencia de anticuerpos específicos, multiplicar las pocas formas presentes o bien a detectar ADN del parásito mediante técnicas de biología molecular.

Serología

El diagnóstico basado en la búsqueda del parásito presenta un notable valor durante la fase aguda de la enfermedad, pero estas técnicas tienen baja sensibilidad durante las fases crónicas, en las que la serología es de gran utilidad y se considera el método de elección.

El diagnóstico serológico en la enfermedad de Chagas se basa en la determinación de inmunoglobulinas específicas de la clase G totales (IgG), aunque otras inmunoglobulinas como las IgM pueden ser detectadas en fase aguda.

Disponemos en la actualidad de un amplio número de test serológicos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas que se diferencian entre sí por el principio de la técnica o los antígenos que utilizan, factores que condicionan su sensibilidad y especificidad. Se conocen como tests convencionales los que emplean como antígeno la totalidad del parásito como la inmunofluorescencia indirecta (IFI) o mezclas de fracciones antigénicas del parásito como la hemoaglutinación indirecta (HAI) o ensayos inmunoenzimáticos (ELISA). En general se considera que las pruebas que utilizan antígenos crudos o totales presentan más reacciones cruzadas, con lo que la especificidad es menor. Los tests no convencionales son aquellos que utilizan antígenos purificados, recombinantes o péptidos sintéticos, entre ellos tenemos las pruebas rápidas de inmunocromatografía.

A pesar de disponer de tantos tests no existe un consenso general en establecer las técnicas de referencia y ningún test está considerado el "gold standard" para confirmar el diagnóstico de infección por este parásito. La serología es un herramienta de gran utilidad en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, pero en ciertas circunstancias ninguna de las técnicas anteriormente descritas sirve como marcador de curación o evolución de la infección, puesto que después de un tratamiento, si hay curación, la seroconversión puede tardar muchos años.

La OMS (2002) debido a la distinta capacidad inmunogénica de las distintas cepas del parásito, la distinta respuesta inmunitaria entre los pacientes y la existencia de reacciones cruzadas con otros tripanosomatidos que coexisten en las áreas endémicas cuando utilizamos antígenos crudos del parásito, recomienda que, al menos, se realicen dos pruebas en paralelo que utilicen antígenos o principios distintos. En consecuencia un individuo está infectado cuando el resultado de dos tests serológicos es positivo.

Un problema que habitualmente se plantea con la serología durante la fase crónica es la obtención de resultados discordantes, indeterminados o no concluyentes. Habitualmente este problema de discordancia de resultados entre técnicas aparecen cuando los títulos serológicos son bajos y cercanos al umbral de positividad lo que supone que decidir la reactividad o no de una muestra conlleva cierta imprecisión.

En aquellos casos en que dos pruebas serológicas distintas, siguiendo las recomendaciones de la OMS, no sean suficientes para confirmar la infección se debe recurrir a una tercera técnica. Los expertos recomiendan que se utilice la IFI que tiene una sensibilidad del 95 % y una especificidad del 100 %. A pesar de ello, muchas veces no es la más aconsejable ya que su lectura es subjetiva, depende de la experiencia del técnico y se recomienda que se realice en un centro especializado. Se han propuesto alternativas a la IFI como las técnicas que utilizan antígenos de secreción-excreción del parásito (TESA) utilizados en inmunoblot o ELISA, glicoproteínas 72 y 90 kDa, detectadas mediante radioinmunoensayo (RIPA) o antígenos recombinantes diversos usados en inmunoblot. A pesar de ello los resultados obtenidos dejan de ser concluyentes, los antígenos o test propuestos no se encuentran comercializados y no están al alcance de los centros de diagnóstico habituales.

OTROS MÉTODOS PARASITOLÓGICOS Y MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

Estos pueden ser utilizados en cualquier fase de la enfermedad siempre que la parasitemia sea baja y no se detecte por otros métodos. Se indican cuando hay dudas diagnósticas o cuando se requiere el aislamiento del parásito para estudios de investigación. Habitualmente se emplean 3 métodos: el xenodiagnóstico, el cultivo *in vitro* y la PCR.

a) Xenodiagnóstico.

Es un procedimiento que utiliza al propio vector para que en su interior se produzca la multiplicación. Consiste en utilizar unos 40 redúvidos repartidos en dos frascos cubiertos por una malla de tela que se ponen en contacto con el antebrazo o piernas del paciente durante 30 minutos, tiempo suficiente para que se produzca la ingesta de sangre por los triatomíneos (Figura 4). Posteriormente se mantiene en el laboratorio durante 30, 60 y 90 días, y se analizan las heces u orina de los insectos en busca de las formas tripomastigotas en movimiento. Esta técnica ha sido utilizada durante décadas. Actualmente se realiza de forma artificial, evitando la exposición directa de los pacientes a los triatomíneos. La sensibilidad de esta técnica es muy elevada y es equiparable a la que proporciona una PCR. Con sensibilidades variables de entre un 9 % hasta un 87.5 % .



Figura 4. A) Xenodiagnóstico B) Epimastigotes presente en las heces de un triatomino infectado.

a) Cultivo *in vitro*

Tiene como objetivo conseguir la multiplicación de las formas parásitas presentes en la sangre del paciente. Los medios utilizados son el NNN (Novy-McNeal-Nicolle) o bien el medio de LIT (Liver Infusion Tryptose) suplementado con un 20 % de suero bovino fetal. El rendimiento es bueno cuando el volumen de sangre es grande, con sensibilidades entre un 40 - 50 %. Lo habitual es utilizar 30 mL de sangre recogida con heparina en días alternos. La sangre se centrifuga y se separa el plasma que contiene los anticuerpos del paciente y pueden inhibir el crecimiento del parásito. El sedimento de hematíes se lava con LIT y se distribuye en 6 tubos que contienen 3 mL de medio LIT. Por otra parte se concentran las células suspendidas en el plasma mediante centrifugación y se siembra el sedimento en 3 mL de LIT. Los cultivos se mantienen en estufa a 28 °C, se examinan mensualmente y se deben mantener al menos durante 3 meses antes de dar un resultado negativo. Cuando hay crecimiento podemos observar las formas epimastigotas del parásito y las tripomastigotas cuando el cultivo es viejo. (Figura 5)

El aislamiento de parásito mediante xenodiagnóstico y cultivo, además de confirmar la infección son de utilidad para la obtención de cepas y realización de estudios de variabilidad genética entre poblaciones del parásito.

b) Reacción en cadena de la polimerasa.

Recientemente la aparición de la PCR ha sido una alternativa a las técnicas convencionales ya que es capaz de detectar parasitemias de muy baja intensidad e incluso fragmentos de parásito.

Existen diferentes PCR que utilizan diferentes dianas del parásito como el minicírculo del kADN y la secuencia repetida del ADN satélite. Los diferentes protocolos de PCR permiten detectar el genoma de un solo parásito e incluso cantidades inferiores.

En zonas endémicas la PCR sólo se utilizaba en estudios de investigación pero actualmente está

sustituyendo otros métodos como el xenodiagnóstico. En países no endémicos la PCR es una herramienta habitualmente utilizada en los bancos de sangre, en el control de posible reactivación postrasplante y en el diagnóstico del Chagas congénito. En pacientes en fase crónica la PCR es una prueba complementaria a la serología, de confirmación y también se utiliza para el



Figura 5. Formas epimastigotas y trypomastigotas teñidas con Giemsa a partir de un cultivo *in vitro* en medio LIT

seguimiento de curación parasitológica posterior al tratamiento.

La PCR se puede realizar sobre diferentes tipos de muestra. En fase aguda sobre sangre, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo y a partir de biopsias de tejido cardíaco o bien de placenta o cordón en los casos de congénita. En los casos de Chagas crónica se puede realizar sobre muestras de sangre o plasma, o de capa leucocitaria.

Un requisito para mejorar los resultados de PCR es la conservación de la muestra. Es aconsejable conservar la muestra a 4 °C o congelada. En el caso de sangre total, se debe mezclar con tampón guanidina 6 M-EDTA 0.2 M lo antes posible para preservar el ADN. De esta forma se puede conservar a temperatura ambiente o nevera, se produce la hemólisis de los hematíes, se homogeniza el ADN y se inhibe la acción de las ADNasas. En condiciones óptimas la sensibilidad de la PCR en fase crónica es de un 50 %, aunque según el protocolo utilizado los resultados de sensibilidad son variables. Probablemente estas diferencias sean debidas al volumen de sangre procesada, a los procedimientos de extracción del ADN o a la región de ADN de *T. cruzi* amplificada.

Dentro de las PCR que se usan la nested PCR proporciona una mayor sensibilidad que la PCR simple. Es una técnica altamente sensible, pero que en cambio consume mucho tiempo y tiene el riesgo de falsos positivos debido a la posibilidad de contaminaciones por amplicones.

Esto no ocurre con la PCR a tiempo real en la que el producto amplificado se detecta por fluorescencia. Los fluorocromos están unidos a sondas de oligonucleótidos que se van acoplado específicamente a la secuencia que se amplifica. La detección de las intensidades de fluorescencia mientras se produce la PCR, hace posible la detección y cuantificación del producto amplificado. La gran ventaja es que es rápida y reduce el riesgo de contaminaciones porque se minimizan las manipulaciones de la muestra. La cuantificación por PCR a tiempo real es limitada en las fases indeterminadas de la enfermedad, sin embargo su potencial es reconocido en el diagnóstico de las infecciones congénitas, en el control de parasitemia durante y después del tratamiento y en la detección precoz de recaídas después del trasplante del corazón y otras situaciones de inmunosupresión.

A pesar de ser una herramienta de gran ayuda en el diagnóstico, actualmente no hay ninguna PCR comercializada, al igual que no hay un consenso general para estandarizar y utilizar una misma PCR. Es una técnica que sólo se realiza en algunos laboratorios de referencia y bancos de sangres.

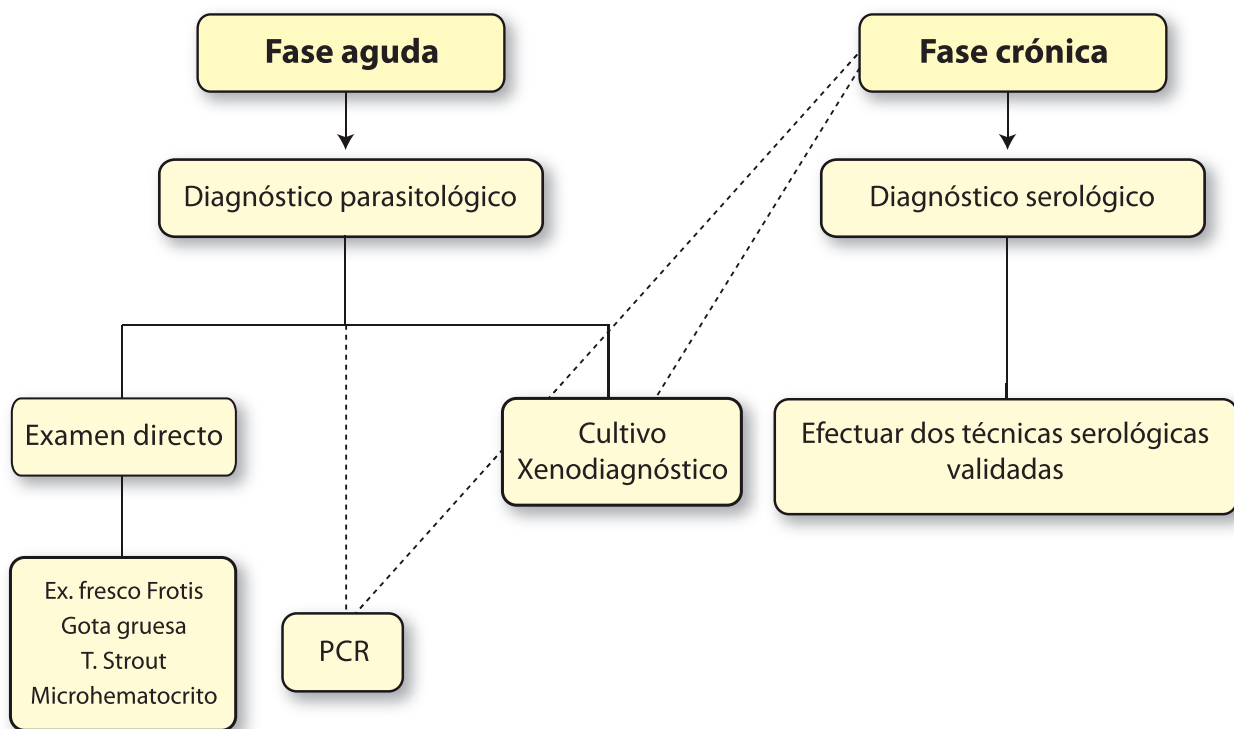


Figura 6. Diagnóstico de la enfermedad de Chagas

En la Figura 6 se esquematiza el algoritmo diagnóstico para la enfermedad de Chagas.

DIAGNÓSTICO DEL CHAGAS CONGÉNITO

Debe realizarse en aquellos casos en que la madre tiene un diagnóstico de Chagas agudo (poco frecuente en área no endémica) o un Chagas crónico.

Hay que tener en cuenta que entre un 60 % y el 90 % de los recién nacidos infectados no presentarán clínica y por lo tanto el diagnóstico, de confirmación, para establecer el tratamiento sólo se podrá hacer mediante pruebas diagnósticas.

Al recién nacido se le realizaran las siguientes pruebas:

a) El microhematocrito: Sacar sangre preferentemente del talón y no sangre de cordón que puede tener sangre materna. Si el microhematocrito es positivo se confirma la infección y hay que establecer el tratamiento lo más rápidamente posible. Paralelamente se puede realizar el examen en fresco, frotis o gota gruesa.

Cuando la parasitemia es baja el microhematocrito puede ser negativo, en estos casos está indicado realizar un cultivo y una PCR a partir de sangre y hacer un seguimiento periódico tanto clínico como parasitológico del niño hasta los 9 meses.

b) Pruebas serológicas: se realizarán siempre que el microhematocrito, el cultivo o la PCR hayan sido negativos. La determinación de anticuerpos específicos se realizará siempre utilizando dos pruebas serológicas validadas. Es importante realizar esta prueba a partir de los 9 meses para evitar la presencia de anticuerpos maternos. Si la serología a los 9 meses es positiva, se confirmará que el niño está infectado y se establecerá el tratamiento.

Otras pruebas que se pueden realizar son la detección de parásitos en placenta por histología o por PCR y en el líquido amniótico, aunque no siempre la detección de *T. cruzi* en estas muestras se puede asociar a una infección congénita.

En la Figura 7 se esquematiza el algoritmo diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita.

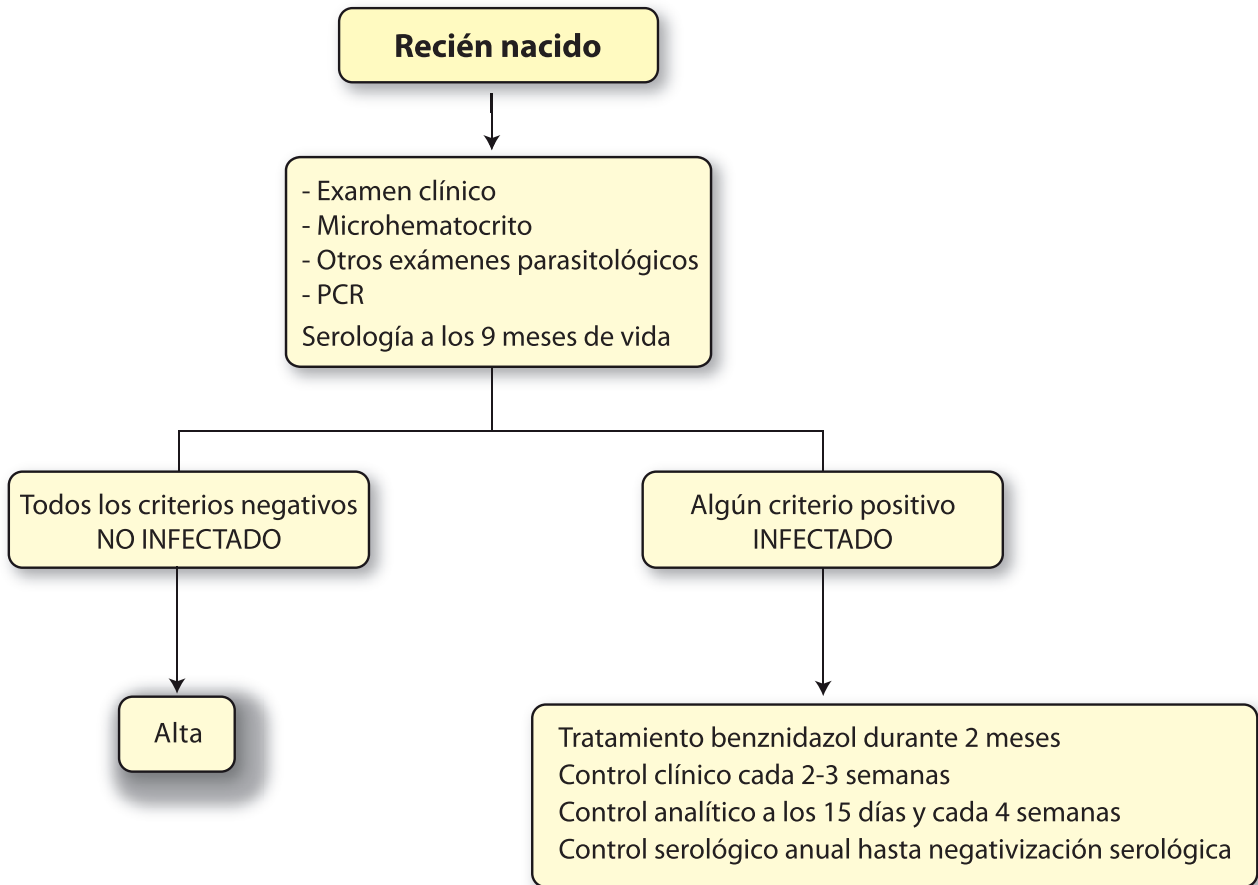


Figura 7. Algoritmo para el diagnóstico de la infección congénita

EDUCACIÓN CONTINUADA EN EL LABORATORIO CLÍNICO COMITÉ DE EDUCACIÓN

M. Rodríguez (*presidente*), D. Balsells, R. Deulofeu, M. Gassó, J.A. Lillo, A. Merino, A. Moreno, MC. Villà

ISSN 1887-6463 – Abril 2013 (recibido para publicación julio 2012)