

Necesidad de estandarizar las técnicas diagnósticas para la enfermedad de Chagas

Basilio Valladares

Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias

Correspondencia:

Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias
Avda. Francisco Sánchez, s/n. 38271 La Laguna. Tenerife. Islas Canarias

Resumen

Para la utilización de una técnica de diagnóstico, ésta debe haber sido estandarizada y validada con anterioridad. La RICET (Red de Investigación de Centros de Enfermedades Tropicales) ha procedido a través de algunos grupos que la componen, a consensuar y a estandarizar las técnicas que deban utilizarse en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. La utilización de las mismas técnicas, permitirá en un próximo futuro la realización de estudios epidemiológicos y que los clínicos del Sistema Nacional de Salud, tengan una herramienta válida y homogénea para el diagnóstico.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*. Estandarización. Diagnóstico.

Summary

The use of a diagnosis method requires its previous standardization and validation. The RICET (Red de Investigación de Centros de Enfermedades Tropicales) has proceed to standardize the methods for diagnosing Chagas disease. The use of the same techniques will allow in a future the establishment of epidemiological studies. Therefore, the clinicians of the National Health System would have a valid and homogenous diagnostic tool.

Key words: *Trypanosoma cruzi*. Standardization. Diagnosis.

Es una obviedad, que para la utilización de una técnica de diagnóstico, ésta debe haber sido estandarizada y validada con anterioridad. En el caso particular de la enfermedad de Chagas en nuestro país, la situación se hace compleja debido a que no es endémica en nuestra zona, a la variedad de técnicas existentes, a los diferentes tipos de patologías que presenta y sobre todo, a las características del parásito que nos ocupa.

Existen en España diversos grupos de trabajo con capacidad para diagnosticar distintos tipos de enfermedades tropicales, entre las que se encuentra la enfermedad de Chagas. Cada uno de ellos, a lo largo del tiempo, ha desarrollado técnicas con diferente sensibilidad y especificidad, y sobre todo, con diferente interpretación de los datos obtenidos en el laboratorio.

El parásito. La enfermedad de Chagas se puede manifestar de formas muy diferentes dependiendo de las regiones geográficas y de factores genéticos tanto del parásito como del hospedador¹.

El genoma nuclear de *T. cruzi*, varía de forma extensiva entre cepas e incluso entre clones de la misma cepa². Los análisis genéticos del cariotipo sugieren que el de *T. cruzi* es diploide y su genoma está distribuido en pares de cromosomas homólogos que se diferencian generalmente en su tamaño. La hibridación de bandas cromosómicas con sondas de DNA específicas han revelado una amplia diversidad en el cariotipo de diferentes cepas de *T. cruzi*. Sin embargo, se ha encontrado una cierta correlación entre estos patrones de hibridación y el encuadramiento de la cepa en un grupo principal u otro. Datos procedentes de estudios de polimorfismos en el tamaño de los cromosomas han servido para obtener información evolutiva sobre los grupos de *T. cruzi*^{3,4}.

Se ha propuesto que los genotipos de *T. cruzi* se pueden distribuir en dos grupos principales, denominados *T. cruzi* I y *T. cruzi* II⁵. El grupo I es relativamente homogéneo, mientras que el II se ha dividido en 5 subgrupos (IIa-IIe)⁶. Estudios epidemiológicos sugieren que las cepas de *T. cruzi* I se encuentran circulando en el ciclo selvático de la transmisión parasitaria mientras que, las cepas del grupo II están relacionadas con el ciclo doméstico y la enfermedad cursa de forma más severa⁷.

Se ha podido comprobar que *T. cruzi* es capaz de realizar intercambio de material genético, sobre todo en la fase del ciclo evolutivo en la que se encuentra parasitando al mamífero. Este tipo de fenómenos permite recorrer mayores distancias génicas que las que cabría esperar por la herencia mendeliana y potencialmente facilita un rápida especiación y evolución posibilitando la adaptación a nuevos hospedadores⁸.

El clon CL Brener (*T. cruzi* sub-group IIe) ha sido elegido como organismo de referencia para el proyecto genoma⁹ y diversos análisis indican que es un organismo híbrido, derivado de intercambios génicos entre cepas de *T. cruzi* I y de subgrupos de *T. cruzi* II¹⁰. Aunque la secuenciación del genoma de CL Brener está casi terminada, está claro que la información obtenida no será suficiente para entender la alta diversidad génica de este parásito. Actualmente se están iniciando las secuenciaciones de los genomas de la cepa Esmeraldo, incluida en el subgrupo II b⁶ y otra de un genotipo no híbrido, que podrán ser comparados con los datos obtenidos en CL Brener. Estos datos también servirán para un mejor conocimiento de la organización y plasticidad en el genoma de *T. cruzi*.

Estudios de cariotipo basados en el tamaño de los cromosomas indican que los cromosomas en sí son una herramienta muy valiosa para la identificación de grupos evolutivos, en particular de cepas híbridas de *T. cruzi*⁴.

Vargas N. *et al*¹¹ en un reciente estudio, han caracterizado y comparado de forma extensiva los cariotipos moleculares de varias cepas del grupo I y del grupo II y de la CL Brener, y han establecido el número y tamaño de los cromosomas. Han localizado también 48 marcadores génicos de RNA y diversas secuencias codificantes de proteínas en los cromosomas. Se ha analizado el tamaño de regiones teloméricas y establecido la distribución cromosómica y la abundancia relativa de las repeticiones en el genoma.

Todo lo anteriormente expuesto, demuestra la tremenda variabilidad del parásito *Trypanosoma cruzi*, que en algunos casos ha llevado a algunos investigadores a plantear la posibilidad de la existencia de más de una especie.

Selección de la técnica adecuada. Existen diversas técnicas de diagnóstico utilizadas en los países de zonas endémicas, pero no existe una técnica universal, estandarizada, validada y admitida por todos, que sirva como diagnóstico de laboratorio de la enfermedad.

Existen técnicas de diagnóstico parasitológico, y serológico que se comentan en el artículo de Cañavate C. *et al* de este mismo número. En este apartado se hace especial énfasis en técnicas moleculares.

Se han desarrollado diferentes métodos para el diagnóstico molecular de la enfermedad de Chagas la mayor parte de ellos basados en la técnica de PCR. Se pueden identificar tres fases importantes en la metodología:

- La obtención de fragmentos de ADN y de sondas específicas para el ADN blanco de interés,
- el desarrollo de sistemas de ensayo que abarquen todas las etapas del proceso y
- la aplicación extensiva del ensayo en el campo para su validación.

La aplicación de estos métodos de amplificación por PCR ha permitido la detección de un gen de copia única por genoma haploide de una célula, por lo que la sensibilidad y la especificidad, se encuentran muy aumentadas. Existen publicados y/o patentados diversas parejas de cebadores capaces de amplificar y diagnosticar *T. cruzi*.

A la vista de lo anteriormente expuesto, algunos grupos que componen la RICET y algún grupo externo a la misma, han iniciado la estandarización de diversas técnicas de diagnóstico.

Para el diagnóstico inmunológico se realizará una técnica de alta sensibilidad aunque sea de baja especificidad, (IFI o ELISA utilizando como antígeno proteínas totales), y un test con alta especificidad teniendo como antígeno proteínas recombinantes.

Para la elección de la cepa a utilizar en la técnica de IFI, se realizaron en el Instituto de Biomedicina y Parasitología López-Neyra de Granada (CSIC) unas sesiones de trabajo evaluando por una parte, el sistema de fijación de los parásitos a los portaobjetos y por otra, la sensibilidad y especificidad de tres cepas distintas de *T. cruzi* (Tulahuen del tipo I, la CL Brener y la Y del tipo II). Como sueros de referencia positivos, se utilizaron sueros de pacientes con enfermedad de Chagas confirmada procedentes de distintas zonas de América Latina. Para la evaluación de las reacciones cruzadas se emplearon sueros de enfermos con leishmaniasis visceral, cutánea y mucocutánea, y como muestras negativas, sueros procedentes de personas sanas residentes en Tenerife, que no habían estado en zonas endémicas de las patologías anteriores.

Los resultados pusieron de manifiesto que para la técnica de IFI, no hay diferencias por la utilización de distintas cepas del parásito.

Las técnicas moleculares, mucho más sensibles y específicas, deben permitir distinguir cepas, pues eso es muy útil, para estudios epidemiológicos, conocimiento y predicción de la patología y, por último, adecuada decisión en el tratamiento. Para este tipo de diagnóstico, diversos grupos españoles están trabajando en la selección y validación de los cebadores más adecuados para el diagnóstico. La primera parte del trabajo se desarrolló en el Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales de Canarias y participaron dos grupos de trabajo del CBM de Madrid, dos del Instituto Lopez-Neyra de Granada, el Instituto de Salud Carlos III y los propios de Instituto de Canarias. Se trabajó con muestras de DNA de diversas cepas de *T. cruzi*, *T. rangeli*, DNA humano y DNA procedente de distintas especies del género *Leishmania*. Se han seleccionado los cebadores de mayor sensibilidad y especificidad y a partir de ahí se seleccionarán en unas segundas jornadas de trabajo, a realizar en el Instituto de Salud Carlos III, las condiciones óptimas de amplificación con el fin de tener el máximo de sensibilidad.

En una segunda fase, se intentará la caracterización de la cepa productora de la patología. Para ello, se actuará utilizando la técnica de RAPD para el diseño de cebadores¹². Ya se han demostrado diferencias moleculares aplicando RAPD en cepas de *T. cruzi*⁶, por lo que el diseño de estas cebadores "cepa-específicos" nos permitirá resolver de forma mucho más sencilla y sin necesidad de tener cultivados los parásitos, la caracterización de la cepa correspondiente.

Bibliografía

1. Souto RP, Fernández O, Macebo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1996; 83:141-52.
2. Devorak JA, Hall TE, Crane MSJ, Mc Daniel JP, Uriegas R. *Trypanosoma cruzi*: flow means cytometric analysis. Analysis total DNA/organism by means of mithramycin-induced fluorescence. *J Parasitol* 1982;29:108-14.
3. Henriksson J, Dujardin JC, Bernabé C, *et al*. Chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi* is mainly progressive and is evolutionary informative. *Parasitol* 2002;124:277-86.
4. Pedroso A, Cupolillo E, Zingales B. Evaluation of *Trypanosoma cruzi* Irbid stocks based on chromosomal size variation. *Mol Biochem Parasitol* 2003;129:79-90.
5. Anónimo. Recommendations from a satellite meeting. *Mem Oswaldo Cruz* 1999;94: 429-32.
6. Brisse S, Bernabé C, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol* 2000;30:35-44.
7. Zingales B, Souto RP, Mangia RH. *et al*. American Trypanosomiasis in Brazil based on dimorphism of rRNA and minixon sequences. *Int J Parasitol* 1998;28:105-12.
8. Gaunt MW, Yeo M, Fram IA. *et al*. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature* 2003;27:421 (6926):936-9.
9. Zingales B, Pereira ES, Oliveira RP, *et al*. *Trypanosoma cruzi* Genome Project; biological characteristic and molecular typing of clone CL Brener. *Acta Trop* 1997;68:159-73.
10. Sturn NR, Vargas NS, Wetenberger SJ. *et al*. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol* 2003;33:269-79.
11. Vargas N, Pedroso A, Zingales B. Chromosomal polymorphism, gene synteny and genome size in *T. cruzi* I and *T. cruzi* II groups. *Mol Biochem Parasitol* 2004;138:131-41.
12. Martínez E, Alonso V, Thomas MC, Quispe MA, González MA, Valladares B. A RAPD method useful for distinguishing *Leishmania* species. Design of specific primers for *L. braziliensis*. *Parasitology* 2003;127:513-17.