

Viernes, 24 de abril

12:15 h.

Tripanosomiasis africana

Moderador: **Neus Camps**

Ponentes: **Pere Simarro,**
José Ramón Franco, José Antonio Ruiz

Situación global

Pere Simarro

Responsable del Programa de Control y Vigilancia Epidemiológica de la Tripanosomiasis Humana Africana. Departamento de Control de Enfermedades Tropicales Olvidadas. Organización Mundial de la Salud (OMS)

La firma en 2001 de un partenariado entre la OMS y el sector privado permitió el lanzamiento de un intenso programa de lucha contra la enfermedad del sueño. Este partenariado ha sido renovado hasta el 2011 y permite además de asegurar el acceso al tratamiento de las poblaciones afectadas (mediante la donación a la OMS de todos los medicamentos actualmente existentes para su distribución gratuita), asegurar la disposición de fondos para apoyar y colaborar con los países donde la enfermedad es endémica, coordinar las acciones de las ONG y las cooperaciones bilaterales para encontrar una sinergia entre los esfuerzos de estos apoyos externos a los países con los de la OMS, y apoyar los esfuerzos de los proyectos de investigación para nuevas herramientas para el control de la enfermedad.

El principal objetivo del programa de lucha y vigilancia de la tripanosomiasis humana africana (THA) de la OMS es el de asegurar a las poblaciones que viven en zonas donde la enfermedad es endémica el acceso al diagnóstico y al mejor tratamiento posible.

En consecuencia, la principal actividad es el apoyo a los programas nacionales de lucha, reforzando sus capacidades y aumentando sus actividades de lucha y vigilancia epidemiológica.

La primera acción para reforzar las capacidades de los países para hacer frente a la THA es la formación y puesta al día del personal implicado en el programa mediante la técnica de "aprender haciendo". Los miembros del programa nacional son incluidos en un equipo móvil formado por expertos internacionales seleccionados por la OMS que desarrollan el trabajo cotidiano, aplicando las nuevas técnicas disponibles. Asimismo los programas nacionales están reforzados con el equipamiento necesario para desarrollar las actividades de diagnóstico y tratamiento. Para aumentar las actividades de lucha y vigilancia epidemiológica, el apoyo a los países se fundamenta en la distribución de reactivos para el barrido serológico de las poblaciones en riesgo, de materiales para el diagnóstico, de medicamentos para el tratamiento, así como el apoyo logístico para el des-

plazamiento de los equipos móviles en las zonas donde la enfermedad es endémica.

El desarrollo de este intenso programa de apoyo a los países nos ha proporcionado un grupo de 358 técnicos en diagnóstico y tratamiento de la THA formados y distribuidos entre la mayoría de los países y focos donde la THA presenta un problema de salud. Mediante cursos internacionales se han formado también a 80 gestores de programas provinciales, regionales o nacionales de lucha contra la THA para 16 países.

El número de personas viviendo en zonas de transmisión sobre las cuales se ha estudiado la presencia o no de la enfermedad por año se ha doblado. En efecto, si en los seis años previos al lanzamiento del programa el número de personas visitadas fue de ocho millones seiscientos mil, el número de personas analizadas durante los seis primeros años del programa ha superado los 17 millones.

Para cerrar el círculo de la lucha y hacerla eficaz, es necesario tratar a los pacientes identificados. Para este fin la OMS ha distribuido gratuitamente más de 1.200.000 ampollas de los diferentes medicamentos utilizados para el tratamiento de la THA.

De los 36 países donde la THA es endémica, 25 han recibido el apoyo exclusivo de la OMS; en 5 ha habido un

apoyo coordinado de la OMS, las ONG y las cooperaciones bilaterales; y en 6 países que no han declarado casos en los últimos veinte años pero en los que la THA está considerada como endémica, se encuentran en el programa de apoyo del próximo año.

El resultado global es que el número de casos declarados y estimados ha disminuido espectacularmente. Hemos pasado de los prácticamente 40.000 declarados y los 300.000 casos estimados de hace unos diez años a los menos de 10.000 casos declarados y los 50.000 casos estimados en el último año.

Entre los 36 países donde la THA es considerada endémica, 21 han declarado cero casos, 8 países han declarado menos de 100 casos anuales, 6 países han registrado más de 100 casos pero menos de 1.000 y, finalmente, un solo país (República Democrática del Congo) ha declarado más de mil casos por año, representando éste solo más del 70% de todos los casos declarados en el continente africano.

Todo este trabajo ha sido el resultado del esfuerzo de los programas nacionales, de sus coordinadores y, en particular, de los técnicos de laboratorio y de los enfermeros que han estado implicados en las labores de diagnóstico y tratamiento. A ellos es atribuible el mérito de estos resultados.

Tripanosomiasis Humana Africana. Avances en el diagnóstico

José Ramón Franco

Departamento de Control de Enfermedades Tropicales Desatendidas (NTD), Organización Mundial de la Salud (WHO)

Resumen

En la situación epidemiológica actual de la THA, nuevos métodos diagnósticos son necesarios. Los avances en este campo han sido escasos pero algunas líneas de investigación están abiertas de cara a conseguir pruebas más sensibles y específicas, menos invasivas, más sencillas de utilizar y adaptadas a las condiciones de trabajo en zonas de escasos recursos. También es necesario un nuevo método sencillo y fiable para determinar la fase de la enfermedad y que al mismo tiempo permita establecer un criterio claro y precoz de curación. La OMS ha firmado un acuerdo con la Fundación para la Innovación de Nuevos métodos Diagnósticos (FIND) para desarrollar nuevas pruebas diagnósticas para el control de la THA, que contemplen la posibilidad de la eliminación sostenible de la enfermedad. En el marco de esta colaboración, la OMS ha constituido un banco de muestras biológicas de THA, capaz de suministrar el material necesario a las instituciones de investigación que trabajan en el desarrollo de nuevas pruebas diagnósticas para la THA.

Palabras clave: Tripanosomiasis Humana Africana. Enfermedad del sueño. Diagnóstico.

Summary

In the current HAT epidemiological situation, new diagnostics tools are needed. The developments in this field have been scarce but some researches are in the pipeline trying to achieve more sensitive and specific tests, less invasive, more user-friendly and adapted to be used in field conditions. There is also an important need for a new simple and reliable test to stage the disease and to assess the cure. WHO has established collaboration with the Foundation for Innovative New Diagnostics (FIND) to develop new simple diagnostic tools for the control of HAT that meet the requirements of a sustainable elimination approach. Within this collaboration, WHO has set up a HAT specimen Bank, which provides samples to research institutions working in new HAT diagnostic tools.

Key words: Human African trypanosomiasis. Sleeping Sickness. Diagnostic.

El primer diagnóstico etiológico de la Tripanosomiasis Humana Africana (THA) fue realizado en 1901 por Dutton y Forde al describir, mediante análisis microscópico, la presencia de tripanosomas en la sangre de un paciente afectado de la enfermedad del sueño¹. Desde entonces el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos ha sido escaso, remarcando el carácter de enfermedad olvidada que tiene la enfermedad del sueño.

Los útiles diagnósticos actualmente empleados en las zonas endémicas se pueden clasificar en métodos serológicos, métodos parasitológicos y métodos de determinación de fase.

Métodos serológicos

- *Test de aglutinación en tarjeta o CATT (Card Agglutination Test for Trypanosomiasis)*: Introducido en 1977², se basa en la detección de anticuerpos mediante la aglutinación macroscópicamente visible de antígenos (triplanosomas liofilizados de la variante antigénica Li.Tat 1.3 teñidos con azul de Comassie). Su aparición supuso un cambio muy importante en los programas de control y actualmente es ampliamente utilizado en el control de la THA *gambiense*, dada su utilidad en la detección activa de casos. Tiene una adecuada sensibilidad (87-98%) y una aceptable especificidad (74-95%)³, pero su producción es complicada y requiere cadena de frío y cierto aparataje para su utilización.

- *Látex T. b. gambiense*: Es similar al anterior pero utiliza una combinación de antígenos diferentes asociados a partículas de látex⁴. Muestra mayor especificidad que el CATT pero menor sensibilidad³.
- *Inmunofluorescencia indirecta (IFAT)*⁵ y *ELISA*⁶: Estos métodos requieren aparataje más sofisticado y un procesamiento más complejo de las muestras, no realizable de forma inmediata en las zonas endémicas.

Métodos parasitológicos

Se basan en la detección del parásito mediante microscopía en diferentes fluidos corporales (linfa, sangre, líquido cefalorraquídeo, médula ósea):

- *Punción ganglionar y análisis del aspirado linfático*⁷: Es un método simple, barato y rápido que produce buenos resultados, pero su sensibilidad es limitada, principalmente en el caso de *T. b. rhodesiense*.
- *Gota fresca y gota gruesa*: Son métodos sencillos y baratos pero de baja sensibilidad ya que analizan únicamente 5-10 μ l de sangre (teóricamente detectarían concentraciones de hasta 5.000 tripanosomas/ml de sangre). Su utilidad es más importante en el caso del *T. b. rhodesiense*, donde las parasitemias son mayores.
- *Centrifugación de tubo capilar (CTC) o técnica de Woo*: Método descrito en 1970⁸, ampliamente utilizado. Requiere un centrifuga de microhematocrito. Permite analizar 50 μ l de sangre, pero esta cantidad puede aumentarse analizando varios tubos (permitirían detectar hasta 500 tripanosomas/ml de sangre).
- *Filtración en columna de intercambio iónico (mAECT)*: Se considera el método parasitológico más sensible para la THA ya que permite analizar 300-350 μ l de sangre (detectaría hasta 100 tripanosomas/ml de sangre). Fue introducido a finales de los 70⁹.

Métodos de diagnóstico de fase

Se basan en el análisis del Líquido Cefalorraquídeo (LCR) obtenido por punción lumbar. Los diferentes parámetros observados son:

- La detección de tripanosomas por análisis microscópico directo o por concentración mediante centrifugación simple modificada¹⁰ o doble centrifugación¹¹.
- El recuento de leucocitos.
- La detección de anticuerpos Ig M mediante aglutinación de látex¹².

En resumen, los métodos de diagnóstico actualmente utilizados:

- Son complejos, difíciles de usar en estructuras de salud de nivel básico.
- Necesitan personal formado y experimentado.
- Requieren cadena de frío.
- Precisan un cierto aparataje y suministro eléctrico.

- Son tediosos y requieren bastante tiempo para obtener resultados.
- Son demasiados caros.
- No son suficientemente sensibles ni específicos.
- Requieren métodos invasivos para la obtención de muestras.

Por el contrario, una situación ideal sería disponer de un test asequible, de fácil utilización que no requiera cadena de frío ni aparataje especial, ni suministro eléctrico, que produzca resultados de forma inmediata, que no sea invasivo y que sea fiable (altamente sensible y específico), siendo útil tanto en la forma *gambiense* como en la *rhodesiense*.

Entre la situación real y la situación ideal hay una gran distancia y los esfuerzos en investigación deben ir encaminados a acortar esa distancia. Lamentablemente hasta el momento escasos avances se han producido, pero varias líneas de investigación prometedoras están abiertas.

Por otro lado, como resultado de los esfuerzos realizados en la última década, la situación epidemiológica actual de la THA muestra una tendencia descendente en el número de casos. En esta situación, los equipos especializados de despistaje activo son cada vez más difícilmente sostenibles. Herramientas diagnósticas fáciles de usar y altamente sensibles y específicas son cada vez más necesarias para integrar el control y la vigilancia epidemiológica de la enfermedad en las estructuras básicas de salud actualmente existentes¹³.

Un problema añadido sería el diagnóstico de la enfermedad en zonas no endémicas (fuera de África) debido a la falta de experiencia en el diagnóstico y manejo de la enfermedad y a la falta de disponibilidad de algunos métodos diagnósticos sencillos¹⁴.

Líneas de investigación en nuevos métodos diagnósticos para la THA

Detección del parásito

En general se trata de mejorar los métodos parasitológicos existentes:

- Mejora del mAECT, haciéndolo más sencillo y rápido de utilizar y mejorando la calidad de los filtros y de la lectura.
- Microscopía de Fluorescencia con un microscopio versátil (Primostar ILED): Retoma el QBC utilizado en los años 90¹⁵, pero con un menor coste y con un microscopio más adaptado y sencillo, utilizable como microscopio normal con y la posibilidad de usarlo también para el diagnóstico de otras enfermedades (malaria, Tb).
- Cultivo "in vitro": En forma de kit de fácil uso (*kit for in vitro isolation*, KIVI¹⁶). El inconveniente es que los tripanosomas no son detectados hasta varios días o semanas después de su inoculación, existiendo un riesgo importante de contaminación que invalida los resultados.
- Membranas de filtración para tripanosomas, que retendrían los tripanosomas separándolos de los componentes

sanguíneos. Existen varios prototipos en estudio, con resultados pobres.

Tests de detección de antígenos

Tratan de detectar antígenos que incluso pueden haber sido liberados por tripanosomas no circulantes (localizados en hígado, bazo, ganglios linfáticos, SNC):

- Test de aglutinación indirecta de tripanosomas o TrypTect CIATT (*Card indirect agglutination test for trypanosomiasis*)¹⁷: Línea de investigación abandonada por la dudosa especificidad de los prototipos desarrollados¹⁸.
- Búsqueda de nuevos antígenos¹⁹, nativos, recombinantes o sintéticos, tales como glicoproteínas invariables de superficie (ISG), glicoproteína específica del "flagellar pocket" del *T. b. gambiense* (TgsCP), oligopéptido B, proteína SRA u otras enzimas.
- Uso de nuevos marcadores para detectar antígenos²⁰, dirigidos hacia epitopes en la ISG o en el oligopéptido B o contra el rRNA 18S. Actualmente se están estudiando:
 - Anticuerpos de cadena simple marcados.
 - Sondas de anticuerpos (PNA o pseudopéptido asociado a bases nucleicas).
 - Aptámeros.
 - Nanobodies marcados.

Tests de detección de anticuerpos

Teóricamente encaminados a la detección de tanto el *T. b. gambiense* como el *T. b. rhodesiense*. Hay investigaciones orientadas a:

- *Mejora del CATT*, utilizando diferentes antígenos (la ISG, la calreticulina, algunas proteasas, la SRA, proteínas del citoesqueleto u otros) disponibles como polipéptidos recombinantes o sintéticos y que por tanto serían más fáciles de obtener, más estables (sin necesidad de cadena de frío) y tendrían mayor sensibilidad y especificidad.
- *Tests de aglutinación para T. b. rhodesiense*, principalmente utilizando formas procíclicas.
- *Tests con nuevo formato como flujo lateral o aglutinación en gel*, que permitan un formato de test rápido.
- *Test no invasivos* (en saliva u orina)²².

Métodos moleculares

Existen diferentes tests pero ninguno ha sido adaptado para su utilización en áreas remotas de escasos recursos. La investigación actual va dirigida a obtener una generación de tests adaptados a estas zonas.

- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Es aplicable a diferentes especímenes (sangre total, sangre desecada en papel Whatman FTA, buffy coat, jugo ganglionar, LCR...). Han sido descritos diferentes métodos con diferentes tipos de extracción de ADN pero ninguno ha sido validado para el diagnóstico en condiciones de terreno²³⁻²⁸.

Se han descrito "primers" específicos para cada subespecie patógena: SRA (serum resistant associated gene) para el *T. b.*

*rhodesiense*²⁹ y TgsGP (*T. b. gambiense* specific glycoprotein) para el *T. b. gambiense*³⁰.

La especificidad y sensibilidad dependen de los diferentes tests pero en general son altas (capaz de detectar 1-40 tripanosomas/ml de sangre), si bien las cifras en condiciones reales distan de las cifras obtenidas en el laboratorio debido a que la aparición de falsos positivos y falsos negativos es frecuente y difícil de explicar. La contaminación de las muestras durante su obtención, transporte y procesamiento es siempre una posibilidad.

Algunos esfuerzos han sido realizados para simplificar la amplificación del ADN y su visualización, lo que facilitaría su aplicación en países africanos.

- *Reacción de amplificación isotérmica: LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)*³¹.
- *Visualización del producto de la PCR por precipitación, turbidez*³¹ o *fluorescencia*³², visibles a simple vista.
- *Detección rápida del ADN amplificado por oligocromatografía en forma de tira reactiva* (test rápido realizable en 5 minutos sin necesidad de equipo especial, tan sólo un calentador en seco)³³.

Existe también la posibilidad de trabajar con DNA del kinetoplasto, que es único invariable y abundante.

En cualquier caso, los tests moleculares desarrollados están lejos de ser adaptados para su utilización en zonas endémicas.

Tests para la determinación de fase

La determinación de la fase de la enfermedad continua siendo crucial ya que el tratamiento depende de la misma. El diagnóstico de fase requiere actualmente una punción lumbar, lo que supone un procedimiento invasivo, complicado, doloroso y que implica cierto riesgo y no siempre es bien aceptado por los pacientes. La punción lumbar es también necesaria para evaluar la evolución de la enfermedad y determinar la curación o recaída. Los criterios actuales utilizados para determinar la fase son inciertos y no siempre confiables. Serían necesarios nuevos marcadores que permitieran detectar de forma más certera la fase de la enfermedad e idealmente sin necesidad de practicar una punción lumbar.

- *Mejora del Látex Ig M*, haciéndolo más estable y más simple de utilizar (*Latex Ig M dry dot*).
- Detección de *marcadores de las reacciones inflamatorias* producidas en el SNC por el tripanosoma:
 - *Citoquinas y quimoquinas* (IL-1ra, IL9, G-CSF, IP-10, MIP-1beta, VEGF, CLX-10).
 - *Factores específicos del parásito*.
 - *Marcadores del daño cerebral*: Proteínas que muestran destrucción cerebral o reacción inmunitaria (antigalactocerebrosidos, proteína fibrilar glial, enolasa neuronal-específica, neurofilamentos)^{34,35}.
- *Leucocitos CD19*.

La combinación de varios de estos indicadores puede dar unos valores de sensibilidad y especificidad satisfactorios³⁶.

- *Detección de antígenos neurológicos en la sangre (o en la saliva u orina)* evitando realizar una punción lumbar.
- *Polisomnografía*³⁷, método no invasivo que registra diferentes parámetros fisiológicos y clasifica el patrón del sueño en función de la aparición del sueño REM. Requiere cierto aparataje y su sensibilidad es variable.
- *Resonancia Magnética (RM)*³⁸, *electroencefalograma (EEG)*: Métodos no invasivos pero poco específicos y no apropiados para su uso en áreas endémicas.

Análisis del perfil proteico (proteómica)

Identifican y cuantifican proteínas presentes en el suero de casos de la enfermedad comparándolos con controles sanos o bien proteínas expresadas de forma diferente según la fase de la enfermedad.

- SELDI-ToF MS (*Surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*)³⁹.
- Electroforesis bidimensional en gel.

Ambas técnicas parecen ser altamente sensibles y específicas pero completamente inaplicables en las condiciones existentes en zonas endémicas. Su interés radica en identificar posibles proteínas que sirvan de marcadores y sean la base para desarrollar tests más sencillos capaces de detectar estos biomarcadores. También se han realizado estudios de metabolitos que pueden aparecer en la orina o saliva de personas afectadas, pero son todavía estudios muy preliminares.

Con la idea de potenciar el desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas sencillas, la OMS y la Fundación para la Innovación de Nuevos métodos Diagnósticos (<http://www.finddiagnostics.org>) firmaron un acuerdo en 2006⁴⁰ para apoyar a instituciones de investigación que trabajen en este campo⁴¹. Dentro de este acuerdo, la OMS está desarrollando un banco de muestras de pacientes de THA y de controles negativos procedentes de zonas endémicas que pone a disposición de los investigadores, material biológico necesario para desarrollar y probar sus prototipos de nuevos tests diagnósticos.

Bibliografía

1. Forde RM. Some clinical notes on a European patient in whose blood a trypanosome was observed. *J Trop Med* 1902;5:261-3. (citado por Steverding D. The history of African trypanosomiasis. *Parasites & Vectors* 2008;1:3. doi:10.1186/1756-3305-1-3).
2. Magnus, E, Vervoort T, Van Meirvenne N. A card-agglutination test with stained trypanosomes (C.A.T.T.) for the serological diagnosis of T. b. gambiense trypanosomiasis. *Ann Soc Belg Med Trop* 1978;58:169-76.
3. Chappuis F, Loutan L, Simarro P, Lejon V, Büscher P. Options for field diagnosis in human African Trypanosomiasis. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:133-45.
4. Büscher P, Lejon V, Magnus E, Van Meirvenne N. Improved latex agglutination test for detection of antibodies in serum and cerebrospinal fluid of Trypanosoma brucei gambiense infected patients. *Acta Trop* 1999;73:11-20.
5. Magnus, E, Van Meirvenne N, Vervoort T, Le Ray D, Wery M. Use of freeze-dried trypanosomes in the indirect fluorescent antibody test for the serodiagnosis of sleeping sickness. *Ann Soc Belg Med Trop* 1978;58:103-9.
6. Lejon, V, Büscher P, Magnus E, Moons A, Wouters I, Van Meirvenne N. A semi-quantitative ELISA for detection of Trypanosoma brucei gambiense specific antibodies in serum and cerebrospinal fluid of sleeping sickness patients. *Acta Trop* 1998;69:151-64.
7. WHO. *Trypanosomiasis control manual*. Geneva, Switzerland: World Health Organization 1983.
8. Woo PT. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta Trop* 1970;27:384-6.
9. Lumsden, WH, Kimber CD, Evans DA, Doig SJ. Trypanosoma brucei: miniature anion-exchange centrifugation technique for detection of low parasitemias: adaptation for field use. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1979;73:312-7.
10. Miézan TW, Meda AH, Doua F, Djé NN, Lejon V, Büscher P. Single centrifugation of cerebrospinal fluid in a sealed pasteur pipette for simple, rapid and sensitive detection of trypanosomes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000;94:293.
11. Cattand P, Miezán BT, de Raadt P. Human African trypanosomiasis: use of double centrifugation of cerebrospinal fluid to detect trypanosomes. *Bull WHO* 1988;66:83-6.
12. Lejon V, Büscher P, Sema NH, Magnus E, Van Meirvenne N. Human African trypanosomiasis: a latex agglutination field test for quantifying Ig M in cerebrospinal fluid. *Bull WHO* 1998;76:553-8.
13. Simarro PP, Jannin J, Cattand P. Eliminating Human African Trypanosomiasis: Where Do We Stand and What Comes Next? *PLOS Med* 2008;5(2):e55. doi:10.1371/journal.pmed.0050055.
14. Lejon V, Boelaert M, Jannin J, Moore A, Büscher P. The challenge of Trypanosoma brucei gambiense sleeping sickness diagnosis outside Africa. *Lancet Infect Dis* 2003;3:804-8.
15. Bailey JW, Smith DH. The use of the acridine orange QBC technique in the diagnosis of African trypanosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992;86:630.
16. Aerts D, Truc P, Penchenier L, Claes Y, Le Ray D. A kit for in vitro isolation of trypanosomes in the field: first trial with sleeping sickness patients in the Congo Republic. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992;86:394-5.
17. Nantulya VM. TrypTect CIATT—a card indirect agglutination trypanosomiasis test for diagnosis of Trypanosoma brucei gambiense and T. b. rhodesiense infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997;91:551-3.
18. Asonganyi T, Doua F, Kibona SN, Nyasulu YM, Masake R, Kuzoe F. A multi-centre evaluation of the card indirect agglutination test for trypanosomiasis (TrypTect CIATT). *Ann Trop Med Parasitol* 1998;92:837-44.
19. Hutchinson OC, Webb H, Picozzi K, Welburn S, Carrington M. Candidate protein selection for diagnostic markers of African trypanosomiasis. *Trends Parasitol* 2004;20(11):519-23.
20. Ndung'u J. Diagnostics for African trypanosomiasis and prospects of improved staging of the disease. *BMC Proceedings* 2008;2(Suppl 1):S33.
21. Akol MN, Olaho-Mukani W, Odiit M, Enyaru JC, Matovu E, Magona J, Okitoi ND. Trypanosomiasis agglutination card test for Trypanosoma brucei rhodesiense sleeping sickness. *East Afr. Med. J.* 1999;76:38-41.
22. Lejon V, Kwete J, Büscher P. Towards saliva-based screening for sleeping sickness? *Trop Med Int Health* 2003;8:585-8.
23. Schares, G, Mehlitz D. Sleeping sickness in Zaire: a nested polymerase chain reaction improves the identification of Trypanosoma (Trypanozoon) brucei gambiense by specific kinetoplast DNA probes. *Trop Med Int Health* 1996;1:59-70.
24. Kabiri M, Franco JR, Simarro PP, Ruiz JA, Sarsa M, Steverding D. Detection of Trypanosoma brucei gambiense in sleeping sickness suspects by PCR amplification of expression-site-associated genes 6 and 7. *Trop Med Int Health* 1999;4:658-61.
25. Jamonneau V, Solano P, Cuny G. Use of molecular biology in the diagnosis of human African trypanosomiasis. *Med Trop* 2001;61:347-54.
26. Radwanska M, Claes F, Magez S, Magnus E, Perez-Morga D, Pays E, Büscher P. Novel primer sequences for polymerase chain reaction-based detection of Trypanosoma brucei gambiense. *Am J Trop Med Hyg* 2002;67:289-95.
27. Solano P, Jamonneau V, N'Guessan P, N'Dri L, Dje NN, Miezán TW, Lejon V, Büscher P, Garcia A. Comparison of different DNA preparation protocols for PCR diagnosis of human African trypanosomiasis in Cote d'Ivoire. *Acta Trop* 2002;82:349-56.

28. Tilley A, Welburn SC, Favre EM, Feil EJ, Hide G. Trypanosoma brucei: trypanosome strain typing using PCR analysis of mobile genetic elements (MGE-PCR). *Exp Parasitol*. 2003;104(1-2):26-32.
29. Radwanska M, Chamekh M, Vanhamme L, Claes F, Magez S, Magnus E, Baetselier P, Büscher P, Pays E. The serum resistance-associated gene as a diagnostic tool for the detection of Trypanosoma brucei rhodesiense. *Am J Trop Med Hyg* 2002;67:684-90.
30. Berberof M, Perez-Morga D, Pays E. A receptor-like flagellar pocket glycoprotein specific to Trypanosoma brucei gambiense. *Mol Biochem Parasitol* 2001;113:127-38.
31. Kuboki N, Inoue N, Sakurai T, Di Cello F, Grab DJ, Suzuki H, Sugimoto C, Igarashi I. Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes. *J. Clin. Microbiol* 2003;41:5517-24.
32. Becker S, Franco JR, Simarro PP, Stich A, Abel PM, Steverding D. Real-time PCR for detection of Trypanosoma brucei in human blood samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2004;50:193-9.
33. Deborggraeve S, Claes F, Laurent T, Mertens P, Leclipteux T, Dujardin JC, Herdewijn P, Büscher P. Molecular dipstick test for diagnosis of sleeping sickness. *J Clin Microbiol* 2006;44:2884-9.
34. Bisser S, Ayed Z, Bouteille B, Stanghellini A, Breton JC, Dumas M, Jauberteau MO. Central nervous system involvement in African trypanosomiasis: presence of anti-galactocerebroside antibodies in patients cerebrospinal fluid. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000;94:225-6.
35. Courtioux B, Bisser S, M'belesso P, Ngoungou E, Girard M, Nangouma A, Josenando T, Jauberteau-Marchan MO, Bouteille B. Dot enzyme-linked immunosorbent assay for more reliable staging of patients with human African trypanosomiasis. *J Clin Microbiol* 2005;43:4789-95.
36. Lejon V, Roger I, Mumba Ngoyi D, Menten J, Robays J, N'Siesi FX, Bisser S, Boelaert, Büscher P. Novel Markers for Treatment Outcome in Late-Stage Trypanosoma brucei gambiense Trypanosomiasis. *CID* 2008;47:15-22.
37. Buguet A, Bisser S, Josenando T, Chapotot F, Cespuglio R (2005). Sleep structure: a new diagnostic tool for stage determination in sleeping sickness. *Acta Trop* 2005;93:107-17.
38. Gill DS, Chatha DS, Carpio-O'Donovan R. MR Imaging Findings in African Trypanosomiasis. *Am J Neuroradiol* 2003;24:1383-5.
39. Papadopoulos MC, Abel PM, Agranoff D, Stich A, Tarelli E, Bell BA, Planche T, Loosemore A, Saadoun S, Wilkins P, Krishna S. A novel and accurate test for human African trypanosomiasis. *Lancet* 2004;363:1358-63.
40. WHO. Development and evaluation of new diagnostic tests for human African Trypanosomiasis. *Weekly Epidemiological Record* 2006;No 6: 59-60.
41. Steverding D. A new initiative for the development of new diagnostic test for human African trypanosomiasis. *Kinetoplastid Biology and Disease* 2006;5:1. doi:10.1186/1475-9292-5-1.

Avances en el tratamiento de la Tripanosomiasis Humana Africana

José Antonio Ruiz Postigo

Médico. Unidad de Enfermedades Tropicales y Zoonosis de la Oficina Regional para el Mediterráneo Este de la Organización Mundial de la Salud. Cairo. Egipto.

Resumen

La Tripanosomiasis Humana Africana (THA) se trata actualmente con medicamentos que fueron introducidos hace más de 80 años. A pesar de los ensayos clínicos realizados en los últimos 10 años ningún medicamento nuevo se ha podido añadir a los ya conocidos para tratar el estadio I, suramina y pentamidina, o el estadio II, melarsoprol, eflornitina y nifurtimox. Los principales avances en el tratamiento de la THA en los últimos 10 años han consistido en el establecimiento de nuevas pautas terapéuticas con los medicamentos existentes. Recientemente se han identificado compuestos como el fexinidazol que podrían representar, dentro de la próxima década, nuevas alternativas para el tratamiento de esta mortal enfermedad.

Palabras clave: Tripanosomiasis humana africana. Enfermedad del sueño. Tratamiento. Eflornitina. Nifurtimox. Fexinidazol.

Summary

Human African Trypanosomiasis (HAT) is currently treated with medicines introduced more than 80 years ago. Despite clinical trials carried out within the last 10 years, no new medicine has been added to the current ones available for stage I, suramine and pentamidine, or stage II, melarsoprol, eflornithine and nifurtimox. The main progress in HAT treatment over the last 10 years has consisted in establishing new protocols with the existent medicines. Recently, compounds like fexinidazole have been identified and it could represent, within the next decade, new alternatives for the treatment of this fatal disease.

Key words: Human African trypanosomiasis. Sleeping sickness. Treatment. Eflornithine. Nifurtimox. Fexinidazole.

Introducción

La Tripanosomiasis Humana Africana (THA) o enfermedad del sueño es una enfermedad mortal si no es tratada a tiempo y con los medicamentos adecuados al agente causal y al estadio de la enfermedad. En la forma causada por el *T.b. rhodesiense*, el estadio I (diseminación hemo-linfática) se trata actualmente con suramina y el estadio II (invasión del sistema nervioso central-SNC) con melarsoprol. En la forma causada por el *T.b. gambiense*, el estadio I se trata con pentamidina y el estadio II con melarsoprol o eflornitina. El nifurtimox se ha utilizado de forma compasiva, en monoterapia o combinado, para recaídas del estadio II de la forma gambiana si bien todavía no se haya registrado para su uso en la THA.

Los medicamentos usados para el estadio I son sencillos de utilizar y con un perfil de seguridad elevado. En cambio el manejo de los medicamentos usados para el estadio II es más complejo y éstos se asocian a una mayor tasa de efectos adversos severos y de mortalidad.

Los fallos terapéuticos se producen con todos los medicamentos utilizados actualmente y las recaídas representan un desafío dado el número limitado de alternativas terapéuticas.

Los medicamentos para el tratamiento el estadio I de la THA fueron introducidos en la primera mitad del siglo pasado y los utilizados en el estadio II durante la segunda mitad, entre los años 1949 y 1981.

Tratamiento actual

Medicamentos usados en el estadio I

El isetonato de pentamidina (sanofi-aventis), introducido en el año 1940 y utilizado para la forma gambiana, se produce actualmente en ampollas de 200 mg para inyección intramuscular a razón de 4 mg/kg/día durante 7 días. Su modo concreto de acción no está todavía dilucidado aunque se ha involucrado la toxicidad mitocondrial en el parásito como uno de los posibles mecanismos de su efecto tripanocida. Las principales reacciones adversas incluyen hipotensión, hipoglucemia, náuseas, vómitos, trastornos del gusto e induración en el lugar de la inyección¹. La tasa de mortalidad suele ser inferior al 1% y la tasa de recaídas generalmente no sobrepasa el 7%².

La suramina (Bayer HealthCare) fue introducida en el año 1922. Es un medicamento tripanocida utilizado actualmente para la forma rodesiana debido a los fallos terapéuticos observados en los 50s en focos de tripanosomiasis gambiana. Se desconoce su modo de acción. Se administra por vía intravenosa a razón de 20 mg/kg/día, 5 a 7 dosis con un intervalo de una semana entre cada dosis. La posibilidad de reacciones fatales, especialmente cuando existe una oncocercosis concomitante, hacen recomendable la administración de una dosis de prueba. Las principales reacciones adversas incluyen la neuropatía, hiperglucemia, coagulopatías e insuficiencia renal, si bien los regímenes utilizados para la THA son lo suficientemente cortos como para obtener un grado de seguridad terapéutica aceptable. El número de fallos terapéuticos notificados es muy bajo³.

Medicamentos usados en el estadio II

El melarsoprol (Sanofi-Aventis) fue introducido en el año 1949. Es un derivado arsenical tripanocida del cual se desconoce su mecanismo de acción. Hasta el año 2000 se utilizaban diferentes pautas terapéuticas que consistían en 3-4 series de 3-4 inyecciones, por vía intravenosa, a dosis crecientes con una semana de intervalo entre cada serie. Posteriormente se introdujo un régimen terapéutico corto de 10 días consecutivos a razón de 2,2 mg/kg/día (máximo 180 mg/día) para la forma gambiana⁴. Si bien el régimen corto no es más seguro presenta la ventaja de disminuir el tiempo de hospitalización y consecuentemente el coste del tratamiento, así como la adherencia terapéutica. El melarsoprol es activo frente a *T.b gambiense* y *T.b rhodesiense*. Actualmente se están realizando estudios clínicos utilizando el régimen corto de 10 días para la forma rodesiana y los resultados preliminares están siendo satisfactorios. La tasa de mortalidad iatrogénica es del 3-5% y suele atribuirse a la encefalopatía reactiva que se registra en el 5-10% de los enfermos tratados de los cuales fallecen como media el 50% de los casos afectados por la encefalopatía. La tasa de recaídas es generalmente del 3-9% pero en los últimos años se han observado tasas de hasta 30% en distintos focos^{6,7}.

La eflornitina (Sanofi-Aventis) fue registrada para el tratamiento de la THA en el año 1990 pero no se ha utilizado como tratamiento de primera línea de forma más generalizada hasta hace menos de 10 años. Posee una actividad tripanostática frente a *T.b gambiense* gracias a la inhibición de la enzima ornitina descarboxilasa. Se administra a razón de 100 mg/kg/6h durante 14 días (150 mg en pacientes \leq 12 años y $<$ 35kg). Los efectos adversos observados más frecuentemente son fiebre, cefalea, hipertensión y trastornos gastrointestinales que generalmente no obligan a la interrupción del tratamiento. La tasa de mortalidad iatrogénica es del 1-2% y la tasa de recaídas inferior al 10%⁸.

Tratamiento de las recaídas

El tratamiento de las recaídas para enfermos previamente en estadio I consiste en administrar un medicamento de los disponibles para el estadio II. Para las recaídas de enfermos ya tratados en estadio II la alternativa consiste en utilizar otro medicamento con las mismas indicaciones, ya sea en monoterapia o combinación terapéutica si se trata de una segunda recaída. En algunos centros de tratamiento el nifurtimox (Bayer HealthCare) se utilizó, a partir del año 1977, para casos que no respondían a los medicamentos habitualmente disponibles (melarsoprol). Su mecanismo de acción está ligado a su capacidad de generar radicales libres y consecuentemente un estrés oxidativo. Sus efectos adversos incluyen polineuropatía, afectación del SNC y trastornos gastrointestinales. Administrado en monoterapia se observa una tasa de recaídas del 20-50%⁹.

Nuevas perspectivas de tratamiento

Combinaciones terapéuticas

Varias combinaciones han sido utilizadas hasta el momento para el tratamiento de recaídas: melarsoprol-eflornitina, melarsoprol-nifurtimox y eflornitina-nifurtimox. Estas combinaciones formaron parte de un ensayo con el objetivo de determinar su viabilidad como tratamiento de primera línea. De todas ellas, los mejores resultados efectividad-seguridad se observaron con la combinación eflornitina-nifurtimox¹⁰.

Los estudios posteriores han confirmado que esta combinación es efectiva y segura comparándola con la eflornitina en monoterapia, con la ventaja que disminuye en un 50% la dosis y la duración del tratamiento con eflornitina (200 mg/kg/12h durante 7 días) al ser asociada al nifurtimox por vía oral (15 mg/kg/día durante 10 días)¹¹. Esta combinación simplifica la utilización de la eflornitina reduciendo los costes y la duración del tratamiento, factores de gran importancia en el contexto del África rural, y se espera pueda evitar la aparición de cepas resistentes a la eflornitina¹².

Nuevos medicamentos

La pafuramidina (DB289), ha sido el único medicamento para la THA que ha entrado en un estudio clínico multicéntrico de fase III desde que se introdujo la eflornitina. El ensayo iniciado en el año 2001 fue interrumpido en febrero del 2008 debido a la aparición de toxicidad renal (glomerulonefritis post-tratamiento)¹³. Se trataba de un medicamento administrado por vía oral durante 10 días para el estadio I en la forma gambiana.

El fexinidazol, de la familia de los 5-nitroimidazoles, fue descubierto a principios de los años 1980 como compuesto con una elevada actividad ante *Trypanosoma cruzi*, *Trichomonas vaginalis* y *Entamoeba histolytica* en estudios experimentales con animales¹⁴. Los datos obtenidos recientemente en ensayos preclínicos, administrado por vía oral, muestran una actividad ante *T.b. gambiense* y *T.b. rhodesiense* atravesando la barrera hemato-encefálica. Se espera que en breve este compuesto entre en el primer ensayo clínico en humanos (fase I)¹⁵.

Conclusiones

Los avances en el tratamiento de la THA no se pueden considerar esperanzadores ya que no se ha conseguido introducir ningún medicamento nuevo en los últimos casi 30 años, hecho que refuerza el carácter desatendido de las poblaciones afectadas por la enfermedad.

Los estudios clínicos realizados en zonas rurales de África en los últimos 15 años han permitido optimizar las pautas de medicamentos existentes, ya sea en monoterapia (melarsoprol) o en combinación (eflornitina-nifurtimox), y al mismo tiempo mejorar la infraestructura de los países endémicos en términos de recursos humanos y técnicos en materia de investigación clínica. La secuenciación del genoma tripanosómico abre la posibilidad de acceder a posibles dianas medicamentosas.

Actualmente existen varios consorcios e instituciones comprometidos, a nivel científico o financiero, para seguir avanzando en el desarrollo de mejores opciones terapéuticas: Las compañías Sanofi-Aventis y Bayer HealthCare donan gratuitamente a través de la Organización Mundial de la Salud (OMS) los medicamentos para tratar la THA; la fundación Bill & Melinda Gates patrocina el Consortium for Parasitic Drug Development, al que pertenecen la Universidad de Carolina del Norte (Estados Unidos) y el Instituto Tropical Suizo (STI-

Basilea), para la investigación de nuevas moléculas; Epicentre, Médicos sin Fronteras, la iniciativa de los medicamentos para enfermedades desatendidas (DNDi) colaboran en una red de búsqueda y reevaluación de moléculas activas existentes en las librerías de los laboratorios y los centros de investigación; la OMS patrocina y coordina estos grupos.

El principal desafío consiste en poder mantener un nivel adecuado de interés en los financiadores de la investigación en THA y poder desarrollar los estudios clínicos en el contexto del África rural, teniendo en cuenta que actualmente el número de pacientes se ha reducido muy significativamente en la mayoría de países afectados por la enfermedad del sueño, donde los recursos humanos siguen siendo insuficientes y los conflictos armados continúan creando inestabilidad social.

Bibliografía

1. Doua F, Boa Yapo F. Human trypanosomiasis in the Ivory Coast: therapy and problems. *Acta Trop* 1993;54:163-8.
2. Dutertre J, Labusquiere R. La thérapeutique de la trypanosomiase. *Med Trop* 1966;26:342-56.
3. Barret MP. Drug resistance in sleeping sickness. WHO expert committee on African trypanosomiasis (sleeping sickness). 2003;96-111.
4. Burri C, Nkunku S, Merolle A, Smith T, Blum J, Brun R. Efficacy of new, concise schedule for melarsoprol in treatment of sleeping sickness caused by *Trypanosoma brucei gambiense*: a randomised trial. *Lancet* 2000;355:1419-25.
5. Pépin J, Milord F, Khonde A, Niyonsenga T, Loko L, Mpia B. Gambiense trypanosomiasis: frequency of, and risk factors for, failure of melarsoprol therapy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994;88:447-52.
6. Legros D, Evans S, Maiso F, Enyaru JCK, Mbulamberi D. Risk factors for treatment failure after melarsoprol for *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis in Uganda. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999;93:439-42.
7. Stanghellini A, Josenando T. The situation of sleeping sickness in Angola: a calamity. *Trop Med Int Health* 2001;6(5):330-4.
8. Priotto G, Pinoges L, Fursa IB, Burke B, Nicolay N, Grillet G, Hewison C, Balasegaram M. Safety and effectiveness of the first line eflornithine for *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness in Sudan: cohort study. *BMJ* 2008;336:705-8.
9. Janssens PG, Demuyndt A. Clinical-trials with nifurtimox in African trypanosomiasis. *Ann Soc Belg Med Trop* 1977;57:475-80.
10. Priotto G, Fogg C, Balasegaram M, Erphas O, Louga A, Checchi F, et al. Three drug combinations for late-stage *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness: a randomized clinical trial in Uganda. *PLoS Clin Trials* 2006;1:e39.
11. www.dndi.org/newsletter/17/1_1.htm (consultado el 6-marzo-2009).
12. Simarro PP, Jannin J, Cattand P. Eliminating human African trypanosomiasis: Where do we stand and what comes next? *PLoS Med* 2008;5(2):e55.doi:10.1371/journal.pmed.0050055
13. http://www.who.int/trypanosomiasis_african/research/molecule/en/ (consultado el 6 de marzo de 2009)
14. Raether W, Seidenath HI. The activity of fexinidazole (HOE 239) against experimental infections with *Trypanosoma cruzi*, trichomonads and *Entamoeba histolytica*. *Ann Trop Med Parasitol* 1983;77(1):13-26.
15. http://www.dndi.org/newsletters/17/10_1.htm (consultado el 6-marzo-2009).