

Inmunodiagnos de las infecciones parasitarias

Se desarrollan instrumentos para la diagnosis de enfermedades que afectan a más de 900 millones de personas

por John B. Castelino

Las infecciones parasitarias constituyen una de las principales causas de enfermedad y sufrimiento de la humanidad. Las manifestaciones del mal abarcan desde fiebres palúdicas hasta deformidades físicas, tales como la "ceguera de río" y la elefantiasis, que son provocadas por infecciones de algunos helmintos filáricos. Las enfermedades parasitarias disminuyen la productividad de la fuerza de trabajo humana y cabe relacionar directamente con esas infecciones parte de la apatía que se observa en las regiones donde estas enfermedades son endémicas. En los peores casos, sobreviene la muerte, como consecuencia directa de la infección parasitaria o de enfermedades virales, bacterianas, nutricionales u otras a las que sucumbe el organismo, debilitado por los estragos de las infecciones parasitarias.

En el desarrollo socioeconómico cada vez se otorga mayor importancia a la salud y la calidad de la vida. De ahí que se preste cada vez mayor atención en el plano internacional a la investigación de las enfermedades tropicales, sobre todo por el Programa Especial de Investigación y Enseñanza sobre las Enfermedades Tropicales del Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD), el Banco Mundial y la Organización Mundial de la Salud (OMS). Cinco de las seis enferme-

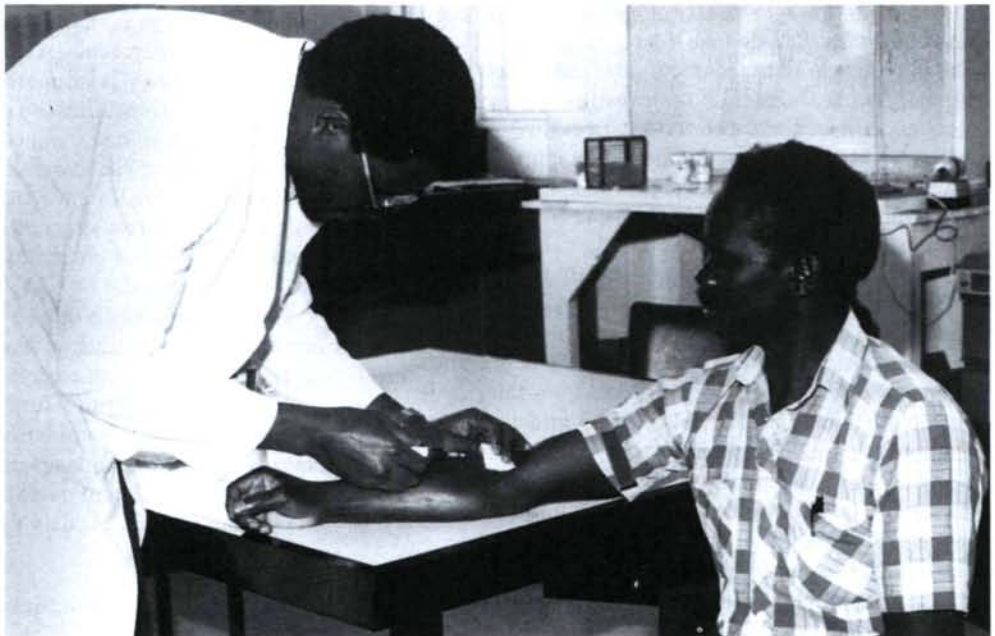
dades que reciben atención prioritaria del Programa Especial son causadas por parásitos: la filariosis, la leishmaniosis, el paludismo, la esquistosomiasis y la tripanosomiasis.

A pesar de este interés, la frecuencia de las infecciones parasitarias parece mantenerse en un nivel elevado. Unos 250 millones de personas padecen de filariosis; un número similar, de esquistosomiasis; unos 400 millones de personas viven en regiones palúdicas, en que 50 millones de casos anuales de paludismo provocan aproximadamente un millón de muertes. Cabe prever que la ampliación de los proyectos de desarrollo, como los planes de riego y reasentamiento, y la creciente densidad de las poblaciones humanas en los trópicos empeoren la situación, a menos que se apliquen medidas eficaces de lucha contra las infecciones parasitarias.

Para que sea posible aplicar estas medidas, es indudable que se necesitan técnicas de diagnóstico de infecciones clínicas. Estas técnicas son también necesarias para estudiar la epidemiología de la infección, es decir, la modalidad de transmisión en la comunidad, y la detección de personas que han padecido la infección en el pasado y que son portadoras de ella con pocos signos clínicos de la enfermedad o acaso ninguno.

Clásicamente, la diagnosis se ha basado en el examen microscópico para verificar la existencia de parásitos o sus huevos en las heces, la orina, la sangre o los

El Sr. Castelino es funcionario de la División de Ciencias Biológicas del Organismo.



Un médico del Centro de Investigaciones Biomédicas de Kenya extrae sangre para realizar un análisis de antígenos parasitarios. (Cortesía: Centro de Investigaciones Biomédicas de Kenya)

materiales de biopsia. Pero este método se considera cada vez menos práctico en las esferas de la diagnosis y la epidemiología. Este es el caso especialmente cuando en los fluidos corporales o en las deposiciones sometidas a examen hay pocos parásitos o sus huevos, como sucede en las infecciones de baja intensidad, en el período inicial de incubación, en las etapas crónicas tardías de la infección o en infecciones como las provocadas por la filaria, que puede encontrarse en los fluidos corporales sólo en determinadas horas del día.

Instrumentos de diagnosis

Una de las defensas del organismo contra los parásitos es su sistema inmunológico. En los parásitos, o dentro de ellos, y en los productos de su secreción o excreción, hay muchas proteínas. El organismo es capaz de generar complejas moléculas proteicas (anticuerpos) que neutralizan algunas de estas proteínas (antígenos) uniéndose a ellas. Las técnicas que miden estos anticuerpos o antígenos también constituyen instrumentos de diagnosis. Este método de diagnosis, que se basa en la reacción de enlace inmunológico entre los anticuerpos y los antígenos, se denomina *inmuno-diagnosis* y los análisis que se realizan para medir estos anticuerpos o antígenos, *inmunoanálisis*.

En el decenio de 1960, se reconoció la función del inmunoanálisis en el estudio de las infecciones parasitarias y su utilidad no sólo en el laboratorio de investigación, sino también en las esferas de la inmuno-diagnosis y la epidemiología. Las técnicas de uso más corriente se basaban en la reacción que se produce entre anticuerpos y antígenos y que da origen a un producto aglutinado o precipitado visible. Aunque se ha comprobado que son técnicas útiles, en algunos casos carecen de sensibilidad. En fecha más reciente han cobrado popularidad los inmunoanálisis basados en reactivos marcados con radionucleidos, enzimas o sustancias fluorescentes, debido a su sensibilidad potencialmente alta para la detección de antígenos y anticuerpos.

Los radioinmunoanálisis (RIA) y los procedimientos afines podrían ofrecer medios de diagnóstico alternativos respecto de los ensayos parasitológicos clásicos. Los nuevos análisis serían de bajo costo, rápidos, sencillos desde el punto de vista técnico y adecuados para satisfacer las necesidades de las investigaciones epidemiológicas en gran escala, sobre todo para evaluar los efectos de los diversos planes nacionales e internacionales de lucha contra las infecciones.

Las pruebas inmunológicas son especialmente necesarias para evaluar la eficacia de la quimioterapia y detectar infecciones en que el número de parásitos es reducido para el examen microscópico. Los ensayos actuales para detectar anticuerpos parecen ser deficientes en este sentido. Sin embargo, la medición de los anticuerpos posee la ventaja de que ofrece indicaciones de la reacción a la inmunización del huésped infectado. En las infecciones en que claramente participan anticuerpos específicos en la defensa inmunológica, como el paludismo y la esquistosomiasis, los inmunoanálisis de los anticuerpos permiten identificar las reacciones de defensa. Este puede ser un indicio importante en la estrategia de investigación para la lucha inmunológica contra las infecciones parasitarias.

La medición de los antígenos de parásitos es una alternativa que ha surgido recientemente en relación con la detección de anticuerpos y varios grupos de investigadores están desarrollando sistemas de análisis, muchas veces basados en anticuerpos marcados. En estos momentos parece posible medir los niveles de antígenos liberados por los parásitos en el suero y la orina del huésped. El OIEA ha creado programas de colaboración para ayudar a evaluar este tipo de ensayos.

La disponibilidad de enzimas y sustancias fluorescentes trazadoras obliga a hacer una selección. Los radionucleidos trazadores permiten realizar una cuantificación sencilla del anticuerpo o el antígeno que se mide. Además, a causa de la baja señal no específica de las mediciones de radiactividad, los radionucleidos trazadores son útiles, sobre todo, en las etapas de desarrollo de los análisis de detección de antígenos. Una vez establecido este sistema de análisis, los trazadores no isotópicos como las enzimas son igualmente adecuados para el uso corriente. De hecho, estos trazadores ofrecen ventajas en muchas circunstancias, lo que hace que disminuya el papel que desempeñan los radionucleidos en esta esfera.

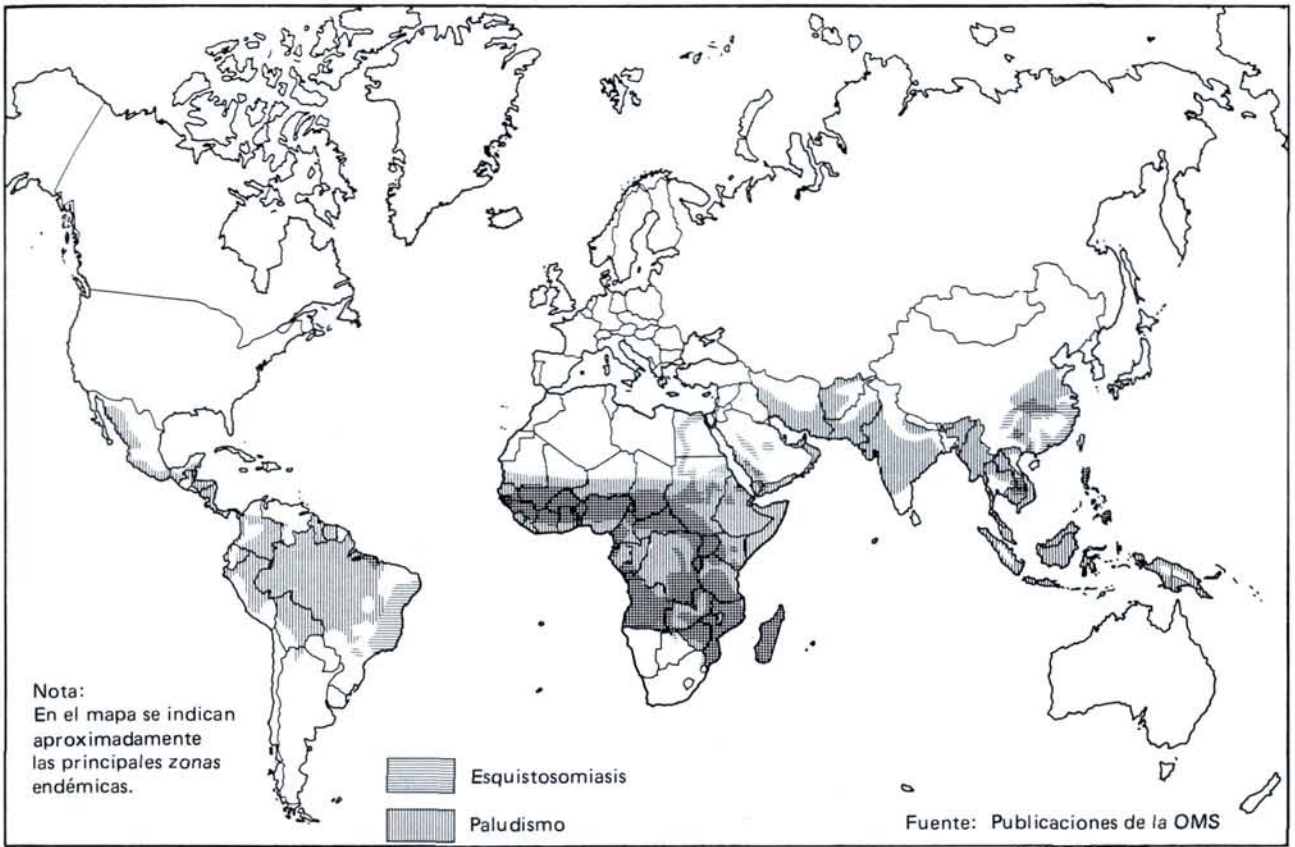
Con todo, los trazadores de radionucleidos no desaparecerán. El costo del equipo de tecnología avanzada necesario para la medición de los trazadores no isotópicos no es inferior al de los contadores de radiactividad y ya hay en existencia una gran cantidad de equipos para el recuento de radionucleidos. Los conocimientos acumulados por el Organismo en el transcurso de los años en la esfera de los inmunoanálisis que utilizan radionucleidos pueden aplicarse sin más a otros trazadores y continuarán desempeñando una función importante no sólo en el desarrollo de los análisis de sensibilidad, sino también en la transferencia de tecnología a Estados Miembros menos adelantados.

Radioinmunoanálisis: Un papel importante

Los principios básicos del inmunoanálisis se establecieron hace unos 30 años en los estudios efectuados sobre el enlace de la insulina radiomarcada y los anticuerpos resistentes a la insulina (anticuerpos anti-insulínicos)*. La base del RIA fue la observación de que la insulina marcada podía ser desplazada por la insulina no marcada. La competencia entre la insulina marcada y la no marcada para enlazarse con los anticuerpos anti-insulínicos (cuyo resultado se puede prever en función de las concentraciones relativas de los diversos reactivos) propició el desarrollo de otras posibilidades para los ensayos de unión que se han utilizado en diversas situaciones para cuantificar las sustancias presentes en los fluidos corporales en cantidades infinitesimales.

Los inmunoanálisis que se basan en reactivos inmunológicos (antígenos de parásitos o anticuerpos) y un radionucleido, una enzima o una sustancia fluorescente podrían desempeñar una función importante en la inmunodiagnosis y la epidemiología. Su sensibilidad es elevada, utilizan cantidades muy pequeñas de antígenos de parásitos o de suero de pacientes, pueden aplicarse en estudios en gran escala y permiten obtener resultados cuantitativos.

* S.A. Berson, R.S. Yallow, A. Bauman, M.A. Rothschild, y K. Newerly, *Journal of Clinical Investigation* 35 (1956).



Distribución mundial del paludismo y la esquistosomiasis

Objetivos de la inmunodiagnos

El objetivo de la investigación en la esfera de la inmunodiagnos de las infecciones parasitarias es desarrollar ensayos rápidos, baratos y fáciles desde el punto de vista técnico que puedan utilizarse en investigaciones epidemiológicas para evaluar los efectos de los diversos planes nacionales o internacionales de control en zonas en que las infecciones parasitarias son endémicas. La investigación deberá proporcionar ensayos con un alto grado de sensibilidad para cada infección específica, lo que permitirá su utilización en la inmunodiagnos aun cuando se disponga de un número reducido de parásitos para los exámenes parasitológicos directos. Este es un requisito importante en los estudios epidemiológicos, puesto que se sabe que en las zonas endémicas sólo una pequeña parte de las personas portadoras de la infección presenta síntomas clínicos.

La investigación en la esfera del inmunoanálisis también deberá proporcionar instrumentos para evaluar la eficacia de la quimioterapia y otras medidas curativas, facilitando así la supervisión del tratamiento. Por último, en la investigación se deberán desarrollar ensayos que permitan identificar a las personas que se hagan inmunes a la infección. Estos ensayos serán importantes para evaluar la eficacia de los programas de vacunación en el futuro, cuando la vacunación antiparasitaria sea una realidad.

Promoción de nuevos adelantos científicos

El desarrollo del RIA y los procedimientos afines no ha alcanzado todavía una difusión que permita reemplazar las técnicas convencionales. Los escollos principales han sido la falta de presiones comerciales para producir los conjuntos necesarios para los ensayos y la

falta de buenos reactivos. La especificidad y la sensibilidad del inmunoanálisis dependen de la tecnología y de los reactivos que se utilicen. La falta de reactivos bien definidos y las reacciones positivas y negativas falsas que se producen como consecuencia de ello constituyen las actuales limitaciones.

La importancia de la necesidad de mejorar los ensayos de inmunodiagnos para su uso en estudios individuales o epidemiológicos se reconoce ampliamente y se refleja en las prioridades establecidas por el Programa Especial de Investigación y Enseñanza sobre las Enfermedades Tropicales del PNUD, el Banco Mundial y la OMS, así como por el componente del subprograma del OIEA sobre enfermedades parasitarias. Los progresos alcanzados recientemente en las técnicas de separación y la producción de antígenos y anticuerpos basadas en la ingeniería genética y la biotecnología auguran un buen futuro para el perfeccionamiento del inmunoanálisis por suerodiagnóstico con la utilización de radionucleidos y otros trazadores. Tanto la OMS como el OIEA propician estos adelantos.

Selección de antígenos para los inmunoanálisis

Todo inmunoanálisis de anticuerpos anti-parasitarios dependerá de la calidad del antígeno. El antígeno adecuado será el que reaccione con los anticuerpos presentes en todos los pacientes infectados. Deberá reaccionar sólo con una especie de parásitos y no con anticuerpos producidos por las infecciones de otras especies. Los parásitos tienen un conjunto de antígenos sumamente complejo y muchos de ellos son semejantes a los de otras especies de parásitos. De ahí que sea necesario aislar los antígenos específicos. Además, el antígeno debe estar libre de sustancias del huésped.

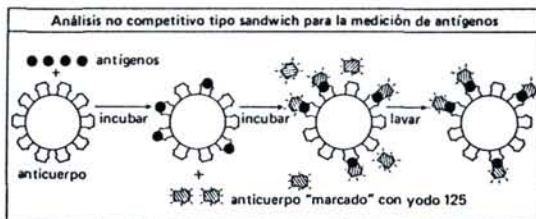
Sistemas de inmunoanálisis

Los sistemas de inmunoanálisis para medir antígenos, anticuerpos y complejos de anticuerpos y antígenos circulantes se pueden clasificar básicamente en dos grupos:

- **El análisis de enlace competitivo**, que depende de la medición de una sustancia en una muestra biológica, al permitirle competir con otra sustancia similar pero marcada para que reaccione con una cantidad limitada de un reactivo de enlace.
- **El análisis de enlace no competitivo**, en que la sustancia que hay que medir (antígeno o anticuerpo) se hace reaccionar con una gran cantidad de reactivo de enlace (anticuerpo o antígeno). El reactivo de enlace se marca con un trazador de manera directa o indirecta.

Los reactivos pueden encontrarse en la fase líquida y reaccionar para formar complejos insolubles que se pueden separar por precipitación. Por otra parte, el reactivo de enlace se puede adsorber en un soporte sólido, como el plástico sobre cuya superficie ocurre la reacción. Esos análisis se conocen como "análisis en fase sólida". El análisis en que el reactivo de enlace, que se adsorbe en una superficie sólida, reacciona con la sustancia que se va a medir y luego la sustancia aislada reacciona con un reactivo de enlace adicional suele denominarse "análisis en fase sólida tipo sandwich".

A continuación se muestran dos ejemplos ilustrativos.



Esto puede resultar difícil en el caso de parásitos íntimamente vinculados con los tejidos del huésped, como ocurre con el parásito del paludismo.

El antígeno debe obtenerse también en cantidades suficientes para realizar investigaciones en gran escala y a un costo razonable. Si se considera que con aproximadamente 1 gramo de helmintos de *schistosoma mansoni* se puede preparar de 1 a 3 miligramos de antígeno específico purificado, resulta evidente que el método analítico deberá ser lo suficientemente sensible como para detectar cantidades mínimas (nanogramo por ensayo) de antígenos puros. El RIA y los procedimientos afines tienen esta sensibilidad.

Con el desarrollo de las técnicas bioquímicas y de ingeniería genética han surgido nuevas estrategias para el análisis de mezclas de material antigénico y para la demostración y el aislamiento de antígenos importantes desde el punto de vista inmunológico. En muchas se utilizan trazadores de radionucleidos para identificar antígenos de interés. El programa del Organismo sobre desarrollo de vacunas contra la esquistosomiasis fomenta la investigación para producir estos antígenos a partir del parásito esquistosoma.

Anticuerpos monoclonales

El cuerpo produce normalmente una gran diversidad de anticuerpos en respuesta a un antígeno determinado. Un importante descubrimiento reciente en la esfera de la biotecnología ha posibilitado la elaboración de preparados aislando los anticuerpos individuales. Cuando en un preparado todas las moléculas del anticuerpo son idénticas, se dice que son "anticuerpos monoclonales" o, en forma abreviada, "monoclonales". Estas moléculas reaccionan de manera idéntica en presencia de un antígeno simple o de parte de un antígeno.

Para la demostración de los antígenos de parásitos, por lo general se utilizan anticuerpos monoclonales en un "análisis en fase sólida tipo sandwich". Mediante este procedimiento se hace reaccionar el anticuerpo monoclonal, que es adsorbido en un soporte sólido, con el suero del paciente y con el antígeno pertinente que se aisló de ese suero. El "sandwich" se completa al hacer reaccionar ese antígeno ligado con el mismo anticuerpo monoclonal, o con otro diferente, que se marca con un radionucleido u otros trazadores que también se enlazarán con el antígeno.

Análisis de anticuerpos

Para medir los anticuerpos antiparasitarios se han utilizado métodos competitivos y no competitivos. Mediante el inmunoanálisis de los anticuerpos se puede diagnosticar la infección y demostrar la inmunidad, en particular cuando en el análisis se utilizan antígenos purificados. No obstante, existe la creencia general de que si bien el inmunoanálisis de los anticuerpos puede reflejar una infección presente o pasada, no permite hacer una fácil distinción entre ambas debido a la persistencia de anticuerpos en los pacientes sometidos a tratamiento. Esto impide su utilización para evaluar la efectividad de la quimioterapia u otras medidas curativas. Además, como hay un período de inactividad entre el momento en que se produce la infección y el momento en que aparecen los anticuerpos en la circulación, con frecuencia el inmunoanálisis de los anticuerpos no permite diagnosticar la infección durante sus etapas tempranas.

Esas dificultades han acelerado el desarrollo de variantes de inmunoanálisis para la detección de antígenos de parásitos circulantes, que en la actualidad se están investigando en varias infecciones parasitarias.

Inmunoanálisis de antígenos de parásitos circulantes

Los parásitos infecciosos introducen los antígenos de parásitos en los fluidos corporales del huésped, y teóricamente podrían servir de marcadores de una infección activa, ya que se espera que sus niveles reflejen la intensidad de la infección. No obstante, la mayoría de los antígenos circulantes originan en el paciente anticuerpos que se enlazan con los antígenos y los eliminan de la circulación. Esos antígenos ligados se degradan y se excretan en la orina. Algunos antígenos de parásitos pueden ser inaccesibles para la inmunodiagnos por su rápida degradación y eliminación. Otros antígenos pueden estar presentes en niveles muy bajos en la circulación, de manera que para medirlos hay que emplear análisis muy sensibles, basados en el radioinmunoanálisis y procedimientos afines.

Otra complicación en los análisis es la presencia de anticuerpos en la circulación, algunos de ellos libres y otros total o parcialmente enlazados con los antígenos circulantes en complejos de antígenos y anticuerpos. Se produciría entonces una competencia entre el anticuerpo que se utiliza como reactivo en el análisis y los anticuerpos del paciente. Además, es probable que

la presencia de otras sustancias no específicas que se encuentran corrientemente en la sangre durante las infecciones parasitarias interfiera en los análisis. Por otra parte, algunos antígenos de parásitos circulantes pueden ser inadecuados para la inmunodiagnosís porque no son específicos de una sola especie de parásitos.

Programa coordinado de investigación del OIEA

El programa de inmunodiagnosís del Organismo se centra en tres infecciones parasitarias: la filariosis, el paludismo y la esquistosomiasis. Es difícil diagnosticar la filariosis porque a menudo sus síntomas se confunden con los de otras enfermedades. Por otra parte, los helmintos que originan la infección pueden no producir las larvas, cuya presencia en la circulación es la base para el diagnóstico mediante exámenes microscópicos clásicos de una muestra de la sangre del paciente. También se pueden presentar problemas análogos, aunque menos graves, durante infecciones crónicas leves de paludismo y parásitos esquistosoma, o tras la curación incompleta de ese tipo de infecciones.

El programa del Organismo estimula el desarrollo de métodos de inmunoanálisis que detecten y midan, de manera eficaz, los antígenos de parásitos en la sangre, el suero y la orina. El programa proporciona el marco para realizar investigaciones en colaboración, mediante las cuales los anticuerpos monoclonales producidos contra antígenos de parásitos específicos se analizan con miras a una posible inmunodiagnosís, utilizando el suero y la orina de personas infectadas y no infectadas de las zonas endémicas. Los anticuerpos monoclonales que se consideran apropiados se utilizan entonces en los análisis de inmunodiagnosís y procedimientos afines para evaluar la pertinencia de los sistemas en las zonas endémicas. Este programa está produciendo resultados alentadores.

Esquistosomiasis

Algunos participantes en el programa, como la Universidad de Leiden (Países Bajos), el Instituto Pasteur de Lille (Francia) y el Walter and Eliza Hall Institute for Medical Research de Melbourne (Australia) han producido varios anticuerpos monoclonales con posibilidades para la inmunodiagnosís de la esquistosomiasis. Algunos de esos anticuerpos se han utilizado en los análisis tipo sandwich, donde el mismo anticuerpo se emplea en la fase sólida y como anticuerpo marcado. Esos anticuerpos son exclusivos de los esquistosomas. El anticuerpo puede detectar antígenos de esquistosoma en el suero o en la orina de los pacientes infectados. Este es un resultado interesante, ya que en las encuestas epidemiológicas es más fácil recoger muestras de orina que de sangre. También cabe suponer que los análisis de orina soslayan el problema de la interferencia que ocasionan factores reumatoides, complejos inmunes y anti-parásitos y anticuerpos que suelen estar presentes en el suero del paciente.

Filariosis y paludismo

En Lille y Melbourne también se han preparado varios anticuerpos monoclonales contra los helmintos filáricos. El análisis tipo sandwich, basado en una combinación de ambos anticuerpos, detectará los antígenos filáricos en el suero del paciente. Tal como sucede con la esquistosomiasis, la exactitud de los ensayos es mejor en las muestras de orina, ya que no se ha encontrado superposición en los pacientes infectados y en los controles endémicos.

Respecto del paludismo, en la Universidad Mahidol de Bangkok (Tailandia), se han preparado varios anticuerpos monoclonales y, en una evaluación preliminar, uno de ellos ha demostrado tener buenas posibilidades para la diagnosís de la enfermedad.

Además de la inmunodiagnosís de las infecciones parasitarias en el hombre, el Organismo tiene un programa de vigilancia de los vectores del paludismo. Todavía no conocemos todas las funciones relativas que desempeñan las diferentes especies de mosquitos en la transmisión del paludismo.

El programa del Organismo estimula el empleo de inmunoanálisis que puedan identificar los esporozoitos del paludismo, las etapas infecciosas del parásito, en las glándulas salivares de los mosquitos. En el programa se emplea un anticuerpo monoclonal que se enlaza con los antígenos del esporozoito. Ese anticuerpo se preparó en el New York University Medical Centre de los Estados Unidos, y se emplea en un análisis tipo sandwich. En una evaluación preliminar realizada en Gambia, Burkina Faso y Malí, el análisis demostró sus amplias posibilidades para la aplicación en gran escala sobre el terreno. Se espera que ese análisis reemplace el clásico examen microscópico de las glándulas salivares de mosquitos frescos para evaluar la presencia de esporozoitos de paludismo, ya que el análisis tipo sandwich es más rápido y puede realizarse con muestras desecadas de mosquitos almacenadas durante varios meses. El análisis permite identificar las especies que provocan el paludismo y brinda estimaciones cuantitativas objetivas de la carga de esporozoitos. La persistencia del paludismo en particular en África, pese a que desde hace decenios se vienen aplicando estrategias de control basadas en insecticidas, destaca la necesidad de un sistema de análisis de esa índole que permita lograr una mejor comprensión de la dinámica y la epidemiología del paludismo.

Por último, el Organismo ha establecido un programa que estimula la aplicación de técnicas de radiación para inmovilizar los anticuerpos anti-parasitarios en soportes sólidos para utilizarlos en los inmunoanálisis. Los anticuerpos anti-esquistosomas suministrados por el Instituto Pasteur, de Lille (Francia), han sido inmovilizados con éxito en soportes de polímeros por el Japan Atomic Energy Research Institute de Takasaki (Japón) y el Centre for Bioengineering de la Universidad de Washington (Estados Unidos). El anticuerpo inmovilizado se mantiene estable a la temperatura ambiente y conserva gran parte de su potencia de inmunodiagnosís.

"Varillas aforadoras" para el terreno

Las encuestas epidemiológicas que entrañan la recogida de muestras de sangre y de orina para la inmunodiagnosís de infecciones se realizan a menudo en zonas alejadas de los laboratorios. El equipo de investigadores emplea varios días para recoger las muestras antes de regresar con ellas al laboratorio central para procesarlas. Esta demora exige que las muestras se mantengan en refrigeración para evitar su deterioro. El programa del Organismo trata de desarrollar "varillas aforadoras" para infecciones como la esquistosomiasis, en las cuales el único antígeno de parásito presente en la orina o en el suero se mantiene estable en el calor. Las varillas aforadoras podrán ser cintas de plástico con un anticuerpo estable polimerizado en un extremo que se pueda hacer reaccionar con la orina o con la sangre sobre el terreno, para aislar el antígeno. La cinta se desecaría entonces y se remitiría al laboratorio central para efectuar el inmunoanálisis empleando enzimas, sustancias fluorescentes o radionucleidos trazadores.