

**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURÍ”
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA**



*INTRODUCCIÓN DE LAS TÉCNICAS DE LA REACCIÓN EN CADENA
DE LA POLIMERASA PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA
TRIPANOSOMIASIS AFRICANA HUMANA.*

Tesis en opción al título de Máster en Parasitología

Autora: Lic. Ana Elisa Rodríguez Díaz

La Habana, 2018

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURI”

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

**Introducción de las técnicas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa
para el diagnóstico de la Tripanosomiasis Africana Humana.**

Tesis en opción al título de Master en Parasitología

Autora: Lic. Ana Elisa Rodríguez Díaz

Tutor: Lic. Jorge Fraga Nodarse DrC.

Asesor: Lic. Yaxsier de Armas Rodríguez DrC.

La Habana, 2018

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ADNk	ADN de kinetoplasto
ARNr-18S	Fragmento 18S de la subunidad ribosomal
A	Base adenina
C	Base citosina
GPI	Glicosilinositol fosfato
G	Base guanina
gGAPDH	Gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenasa glicosomal
HSP70	Proteína de choque térmico de 70 kDa
hsp70	Gen que codifica la proteína de choque térmico de 70kDa
IPK	Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”
LCR	Líquido cefalorraquídeo.
LNRP-IPK	Laboratorio Nacional de Referencia de Parasitología del Instituto de
L. donovani	Medicina Tropical “Pedro Kourí”
NCBI	Leishmania donovani
OMS	Centro Nacional de Información Biotecnológica Organización Mundial de la Salud.

P. falciparum	Plasmodium falciparum
RCP	Reacción en cadena de la polimerasa
RIME	Elemento móvil de inserción repetitiva
RFLP	Análisis del Polimorfismo de los Fragmentos de Restricción
SNC	Sistema Nervioso Central
SRA	Genes asociados a la resistencia al suero
SSU-rRNA	Subunidad pequeña del ARN ribosomal
T. brucei	<i>Trypanosoma brucei</i>
T. b. gambiense	<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>
T. b. rhodesiense	<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>
T	Base timina
TAH	Tripanosomiasis Africana Humana
mAECT	Técnica de centrifugación de intercambio aniónico Glicoproteínas
VSGs	de superficie variables

AGRADECIMIENTOS

Mi mayor agradecimiento al colectivo del IPK y en particular al departamento de Anatomía Patológica y Rayos X donde crecí profesionalmente, gracias a la ayuda incondicional de la Dra. Virginia Capó y Dr. Daniel Portela quienes dieron el impulso necesario para comenzar mi carrera universitaria, a través de la confianza, la exigencia y el rigor en los estudios.

Al Dr. Jorge Fraga Nodarse por brindarme el tema para realizar mi estudio y ayudarme a entender que el primer paso para alcanzar el éxito es la proposición de una meta y la fuerza con que hagamos cada una de las obras para alcanzarla.

A mis amigas de siempre Ledy López Fuentes y Marielvys González Peña por brindarme sus experiencias desde sus puntos de vista, así como el apoyo, el tiempo y la defensa por la realización de este trabajo como si fuera propiamente de ellas.

A mis compañeros del laboratorio de Anatomía, que durante todo el tiempo del estudio me apoyaron y me dieron fuerza aún cuando la culminación de este trabajo parecía imposible, llegue a la Dra. Jennys, Marina, Víctor, Reglita y Tahidy mis más sinceros agradecimientos.

Agradezco especialmente la paciencia, entrega y dedicación del DrC. Yaxsier de Armas, gracias amigo por ser como eres y brindarme parte de tu tiempo.

A Yenlis Pérez Viltres, gracias amiga por el apoyo y la paciencia en el proceso de cuidado de mi hija para poder continuar.

A mi esposo por brindarme todo su apoyo y estar a mi lado aún cuando la vida se me pone difícil, por ser mi bastón y compañero en todas las batallas sin su apoyo nada fuese posible.

Finalmente mi agradecimiento más profundo y sincero a mi abuelo donde quiera que este aún me acompaña porque él ha sido y es para mi un magnífico ejemplo de dedicación al trabajo, honestidad, ética y disciplina.

DEDICATORIA

*....A la Luz de mis ojos, Sabrina,
bendición del presente y el futuro.*

RESUMEN

La Tripanosomiasis humana africana (TAH) es causada por subespecies del protozoo parásito *Tripanosoma brucei* y es transmitida por moscas tse-tsé que son endémicas solo en el África subsahariana. Aunque la TAH es poco común entre pacientes de países no endémicos, ha habido un aumento en el número de casos notificados en los últimos años en América del Norte y Europa, debido a viajeros, expatriados, personal militar que regresa del exterior o a inmigrantes de áreas endémicas. De ahí que se recomienda la creación de centros de referencia en hospitales o institutos en países no endémicos, donde la experiencia en el diagnóstico y el acceso a los tratamientos estén disponibles. Se considera que las técnicas moleculares serían de gran utilidad en el diagnóstico en países no endémicos. Entre los métodos moleculares, la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) se ha propuesto para el diagnóstico y seguimiento postratamiento de la TAH. Por lo anteriormente expresado se evidencia la necesidad de contar en el Laboratorio Nacional de Referencia de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (LNRP-IPK), con herramientas moleculares que permitan detectar con validez y seguridad diagnóstica la TAH. En este estudio se introdujo en el LNRP-IPK las técnicas de la RCP-ARNr18S y la RCP-hsp70Tb, esta última totalmente diseñada y evaluada en el presente trabajo. Se validaron las técnicas de RCP para el diagnóstico de *T. brucei*. Las RCP mostraron alta sensibilidad analítica para las subespecies del parásito, así como una buena especificidad y resultados satisfactorios de repetibilidad y reproducibilidad. Excelente concordancia mostraron los dos métodos de RCP evaluados en el panel de muestras estudiadas. Finalmente, el LNRP-IPK cuenta con herramientas diagnósticas que pueden ser utilizada para la detección de *T. brucei* a partir de muestras clínicas.

ÍNDICE

SECCIÓN	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OJETIVOS	6
2.1. Objetivo general	6
2.2. Objetivos específicos	6
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
3.1 Clasificación taxonómica de <i>Trypanosoma brucei</i>	7
3.2. Parásitos	11
3.3. Ciclo de vida del parásito	11
3.4. Vías de transmisión	15
3.5. Epidemiología	16
3.6. Manifestaciones clínicas	18
3.7. Diagnóstico	20
3.7.1. Diagnóstico serológico	21
3.7.2. Diagnóstico parasitológico	22
3.7.3. Diagnóstico molecular	23
3.7.4. Proteínas de choque término: HSP70	26
3.7.5. Determinación de la etapa de la enfermedad	26
3.8. Tratamiento de la Tripanosomiasis Africana Humana	27
3.9. Situación de la Tripanosomiasis Africana Humana en países no-endémicos	28
3.9.1 Situación de la Tripanosomiasis Africana Humana en Cuba	29
4. MATERIALES Y MÉTODOS	30
4.1. Tipo de estudio y contexto de la investigación	30
4.2. Universo de trabajo	30
4.2.1. Cepas de referencia	30
4.2.2. ADN de otros patógenos	31
4.2.3. Muestras clínicas	32
4.3. RCP-ARNr 18S y RCP-hsp70 para la detección de las subespecies de <i>T. brucei</i> .	32

4.3.1. Cebadores de la RCP-ARNr 18S	32
4.3.2. Diseño de los cebadores para la RCP-hsp70 Tb	33
4.3.3. Normalización de la RCP basada en el gen ARNr 18S y hsp70	33
4.3.4. Sensibilidad analítica de la RCP- ARNr 18S y hsp70	34
4.3.5. Especificidad analítica de la RCP- ARNr 18S y hsp70	35
4.3.6. Repetibilidad y reproducibilidad de la RCP- ARNr 18S y hsp70	35
4.3.7. Evaluación de la validez diagnóstica de las RCP-ARNr 18S y la RCP-hsp70 para la detección de <i>T. brucei</i> en muestras clínicas	36
4.4. Procesamiento estadístico	36
4.5. Consideraciones éticas	36
5. RESULTADOS	37
5.1. Diseño de los cebadores para la RCP-hsp70 Tb	38
5.2. Normalización de la RCP basada en el gen ARNr 18S y hsp70	40
5.3. Determinación de la sensibilidad y especificidad analíticas de las técnicas de RCP-ARNr 18S y RCP-hsp70 Tb. Repetibilidad y reproducibilidad	43
5.4. Evaluación de la validez diagnóstica de las RCP-ARNr 18S y la RCP-hsp70 para la detección de <i>T. brucei</i> en muestras clínicas	47
5.5. Concordancia de los métodos de las RCPs (RCP-ARNr 18S y RCP-hsp70Tb)	50
6. DISCUSIÓN	51
7. CONCLUSIONES	58
8. RECOMENDACIONES	59
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1. INTRODUCCIÓN

La Tripanosomiasis africana humana (TAH), también llamada enfermedad del sueño, es una enfermedad que amenaza a millones de personas en 36 países del África subsahariana y es provocada por el parásito *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*), protozoo que se transmite al ser humano por la picadura de la mosca tse-tsé (género: *Glossina*). *T. brucei* incluye tres subespecies morfológicamente indistinguibles: *T. brucei brucei*, que causa la tripanosomiasis africana en animales (Nagana) y no es infeccioso para los seres humanos, mientras que *T. b. rhodesiense* y *T. b. gambiense* pueden infectar a las personas como consecuencia de la resistencia a la apolipoproteína A1 (una proteína sérica que desencadena la muerte en otros *Trypanosoma*) (Pays *et al.*, 2014). Estas dos subespecies presentan distribución geográfica, manifestaciones clínicas y evolución de la enfermedad diferentes. La tripanosomiasis provocada por *T. b. rhodesiense*, es endémica en 13 países de África oriental y meridional y causa la muerte en algunos meses, mientras que la variante causada por *T. brucei gambiense*, es endémica en 24 países de África occidental y central y responsable del 97,6% de los casos notificados de la enfermedad del sueño. Tiene un curso crónico como consecuencia de la adaptación de este protozoo al huésped humano (Carod-Artal *et al.*, 2009). Aún cuando el número de casos ha descendido en los últimos años, en el año 2016 se notificaron 2 184 casos nuevos y se estima que el número de casos reales sea de 30 000 (OMS, 2017). Los habitantes de zonas rurales con poco acceso a los servicios de salud y que se dedican al trabajo de la agricultura, la pesca, la ganadería o la caza son las personas que están más expuestas al contacto con la mosca tse-tsé y por consiguiente a contraer la enfermedad. La prevalencia varía de un país a otro; los países que notifican un mayor número de enfermos son: La República Democrática del Congo, La República Centroafricana, Chad, Angola, Malawi, Sudán y Uganda (Blum *et al.*, 2012; OMS, 2017; Büsher *et al.*, 2017).

La TAH avanza en dos etapas diferentes que requieren distintos regímenes de tratamiento. En la primera, los tripanosomas se multiplican en los tejidos subcutáneos, la sangre y la linfa (Etapa I, Fase Hemolinfática) y se caracteriza por episodios de fiebre, cefaleas, dolores articulares y prurito. Seguidamente la enfermedad progresa a la segunda etapa en que los

parásitos atraviesan la barrera hematoencefálica e infectan el sistema nervioso central (SNC), lo que se conoce como fase neurológica o meningoencefálica (Etapa II, Fase Meningoencefálica). Por lo general a partir de esta etapa es cuando se presentan los signos y síntomas más característicos de la enfermedad, tales como: cambios de comportamiento, ansiedad, confusión, trastornos sensoriales y falta de coordinación. Además, se constata somnolencia durante el día, la cual puede ser incontrolable (Brun *et al.*, 2010; Simarro *et al.*, 2014; OMS, 2017).

El diagnóstico de la enfermedad se realiza en tres etapas: 1) Detectar la infección potencial, lo que implica el uso de pruebas serológicas (solo disponibles para *T. brucei gambiense*) y la verificación de los signos clínicos, especialmente los ganglios linfáticos cervicales aumentados de tamaño, 2) Establecer si el parásito está presente en los fluidos corporales, 3) Determinar el estado de la progresión de la enfermedad, para ello se examina el líquido cefalorraquídeo (LCR) que se obtiene por punción lumbar. El diagnóstico debe hacerse lo más temprano posible para evitar el progreso a la etapa neurológica con el fin de eludir los procedimientos de tratamiento complicados y riesgosos (Büsher *et al.*, 2017).

A partir de que la TAH no tiene signos y síntomas distintivos tempranos, el primer paso en el diagnóstico es la detección serológica de anticuerpos específicos (OMS, 2017). El método más común es la prueba de aglutinación directa denominada Prueba de Aglutinación en Tarjeta para Tripanosomas (CATT, siglas en inglés) (Magnus *et al.*, 1978). Esta técnica serológica es útil para identificar casos sospechosos (Checchi *et al.*, 2011). No obstante, presenta baja sensibilidad, resultados equívocos y no detecta *T. b. rhodesiense* (Brun *et al.*, 2010). Los casos con serología positiva se consideran “sospechosos” y necesitan de otros exámenes para la confirmación parasitológica, lo que constituye la segunda etapa del diagnóstico (Checchi *et al.*, 2011).

Los métodos utilizados para la confirmación de esta enfermedad son inexactos debido a la inadecuada sensibilidad y especificidad de las pruebas disponibles (Radwanska *et al.*, 2010). El diagnóstico se basa en la visualización del parásito mediante microscopía, ya sea en fluidos corporales por medio de aspirados de ganglios linfáticos, sangre periférica o LCR. El estudio del LCR ayuda a establecer el grado de progresión de la enfermedad y permite

determinar posteriormente el tratamiento apropiado para cada caso. No obstante, el empleo de este tipo de muestra presenta una sensibilidad limitada. La OMS establece como criterios para definir la etapa meningoencefálica en los pacientes, la presencia del parásito en el LCR, o de más de cinco leucocitos por microlitros, o ambas (Brun *et al.*, 2010).

Recientemente, se han utilizado las técnicas moleculares para el diagnóstico de la enfermedad, la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) actualmente se muestra a la vanguardia para el diagnóstico de los estadios de la enfermedad, así como de las subespecies que causan la infección. Los métodos de la RCP para el diagnóstico de la TAH en sangre muestran una sensibilidad diagnóstica de 99% y una especificidad diagnóstica de 97,7% (Mugasa *et al.*, 2012). La sensibilidad de la RCP para distinguir entre el estado I y II de la TAH varía entre 88 a 100% y la especificidad entre 56 y 83%. Teniendo en cuenta estos resultados se considera importante la cuidadosa evaluación de la RCP antes de su aplicación (Mugasa *et al.*, 2012) así como realizar estudios de evaluación de técnicas de la RCP y comparación de diferentes ensayos con vistas a determinar el método con mejores valores de sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la Enfermedad del Sueño.

La limitación fundamental de la RCP es la no disponibilidad de la técnica en áreas endémicas, debido a su complejidad y a la demanda de personal especializado, pero con el incremento del desarrollo de capacidades en los laboratorios de estas áreas, se espera un incremento en la utilización de estos métodos (Mugasa *et al.*, 2012). Los genes que permiten el diagnóstico diferencial de *T. b. rhodesiense* y *T. b.gambiense* resultan candidatos altamente atractivos para el diagnóstico molecular de la TAH, lo que ayuda al diagnóstico específico en lugares donde circulan estas dos subespecies o en países no endémicos, donde pueden llegar personas infectadas con cualquiera de las subespecies del parásito (Picozzi *et al.*, 2005).

Diferentes secuencias dianas se han utilizado para el diagnóstico molecular de *T. brucei* entre ellas se encuentra el ARNr 18S (Deborggraeve *et al.*, 2011), el ADN satelital (Solano *et al.*, 2002), genes asociados a sitios de expresión 6 y 7 (ESAG6/7) (Kabiri *et al.*, 1999), la glicoproteína específica de *T. b.gambiense* (TgsGP) (Picozzi *et al.*, 2005) y los genes

asociados a la resistencia al suero (SRA) (Picozzi *et al.*, 2005). Los mejores resultados se hallaron utilizando las dianas genéticas ARNr 18S y el ADN satelital, pero su comparación se encuentra limitada por la diferencia en el número de pacientes utilizados entre los diferentes estudios (Mugasa *et al.*, 2012).

Otra de las secuencias diana que puede tener importancia para el diagnóstico de los *Tripanosomas* responsables de la enfermedad del sueño es la proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70). Esta se encuentra altamente conservada en procariontes y eucariontes tanto en secuencia como en función y presenta gran importancia como chaperonas moleculares, el plegado de las proteínas y la translocación (Hartl *et al.*, 2002). Los genes que codifican la HSP70s citoplasmática fueron los primeros genes de kinetoplastideos clonados y secuenciados por su naturaleza conservada (Folgueira *et al.*, 2007). Este gen ha sido utilizado por nuestro grupo de trabajo para la identificación de especies de *Leishmania* del Nuevo y el Viejo Mundo utilizando la técnica de la RCP seguido del análisis del Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP), mostrando alta sensibilidad y especificidad y porcentaje de tipificación de especie (García *et al.*, 2004; Montalvo *et al.*, 2010; Graça *et al.*, 2012; Fraga *et al.*, 2012;2013;Veland *et al.*, 2012; Montalvo *et al.*, 2014; 2015; 2017). Además se diseñaron y evaluaron métodos de RCP dúplex y RCP-RFLP para la diferenciación de *T. cruzi* y *T. rangeli* basados en el gen hsp70 que han mostrado una alta sensibilidad, especificidad analítica y diagnóstica (Fraga *et al.*, 2014). De ahí que este gen constituye un marcador promisorio para la detección de *T. brucei* y la posible tipificación de sus subespecies.

Aunque en los países no endémicos no es obligatorio el reporte de casos de TAH, este se ha visto favorecido ya que la distribución de drogas anti-tripanosomátidas es solo responsabilidad de la OMS, con ello se mantiene un sistema de vigilancia en estos países. En la actualidad se han diagnosticado personas con TAH fuera de los países endémicos entre ellos viajeros, turistas, expatriados y migrantes. (Simarro *et al.*, 2012). reportaron la presencia de 94 casos entre los años 2 000 y 2010 en 19 países no endémicos de la enfermedad, 72% estaban infectados con *T. b. rhodesiense* y 28 con *T. brucei gambiense*. Los casos infectados con *T. b. rhodesiense* eran turistas que habían visitado los países

endémicos por corto tiempo, y los casos diagnosticados con *T. b. gambienses* eran de personas que habían vivido en los países endémicos por largos períodos de tiempo (Simarro *et al.*, 2012). En todos los casos analizados, los pacientes han sido frecuentemente mal diagnosticado con malaria u otras enfermedades transmitidas por garrapatas. Aunque el riesgo de TAH en viajeros es bajo, no debe ser pasado por alto. Para esto es necesario que los laboratorios de referencia en países no endémicos cuenten con los métodos de diagnóstico de la enfermedad y en específico se considera que las técnicas moleculares pueden ser de gran utilidad en este sentido (Blum *et al.*, 2012). Además, las pruebas serológicas no se han validado en viajeros, su sensibilidad varía de una región a otra y la especificidad es por debajo del 61% (Louis *et al.*, 2001; Truc *et al.*, 2012).

Es válido mencionar que en Cuba, país no endémico de la TAH, no hay reportes de personas enfermas y no existe el riesgo de la transmisión vectorial, debido a la inexistencia del vector. Sin embargo, existe la posibilidad de la entrada en el país de cubanos o extranjeros con enfermedad del sueño como resultado del constante flujo de personas procedentes de áreas endémicas de la TAH, la presencia de estudiantes africanos que provienen de países endémicos de la enfermedad y colaboradores cubanos que permanecen por largos períodos de tiempo en países donde la enfermedad es endémica. Por estas razones se evidencia la necesidad de que en el Laboratorio Nacional de Referencia de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (LNR-IPK) cuente con herramientas moleculares que permitan el diagnóstico de la Enfermedad del Sueño.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Introducir métodos moleculares basados en la RCP para el diagnóstico de la TAH en el LNRP-IPK

2.2. Objetivos específicos

- Validar la técnica de la RCP para el diagnóstico de la TAH basado en el gen que codifica el ARN ribosomal 18S.
- Validar el método de la RCP basado en el gen que codifica la proteína de choque térmico de 70kDa para la detección *T. brucei* responsable de la Enfermedad del Sueño.
- Determinar la concordancia diagnóstica entre ambos métodos moleculares.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. Clasificación taxonómica de *Trypanosoma brucei*

Dentro de la familia Trypanosomatidae, el género *Trypanosoma* es uno de los más importantes. Incluye una serie de especies que ocasionan enfermedades en humanos, como son: *T. b.gambiense* y *T. b. rhodesiense*, agentes causales de la enfermedad del sueño en el hombre, *T. cruzi*, agente causal de enfermedad de Chagas y *T. brucei brucei*, *T. equiperdum* y *T. equinum*, que causan la enfermedad en animales. La ubicación sistemática de *Trypanosoma brucei* es la siguiente:

Reino: Protista

Subreino: Protozoa

Phylum: Sarcomastigophora

Sub-phylum: Mastigophora

Clase: Zoomastigophorea

Orden: Kinetoplastida

Suborden: Trypanosomatina

Familia: Trypanosomatidae

Género: *Trypanosoma*

Subgénero: *Trypanozoon*

Especie: *brucei*

Subespecies: *brucei*

gambiense

rhodesiense

Trypanosoma brucei, (Phylum Sacromastigophora, orden Kinetoplastida), es un parásito protozoario extracelular que posee un núcleo colocado centralmente y un kinetoplasto, un organelo separado que contiene ADN nuclear. El kinetoplasto es el sitio de inserción de una membrana ondulante, que se extiende sobre casi toda la longitud de la célula y termina como un flagelo libre (Hoare *et al.*, 1972).

Las tres subespecies de *T. brucei* son indistinguibles desde el punto de vista morfológico. Sin embargo, difieren de manera considerable en su interacción con su huésped mamífero y en el modelo epidemiológico de las enfermedades que causan. Anteriormente, los aislados de *T. b. gambiense* y *T. b. rhodesiense* se caracterizaban mediante el análisis de isoenzimas o por medio de inoculación en animales. El advenimiento de las técnicas moleculares creó expectativas de recursos más fiables para su diferenciación. La caracterización genómica ha revelado varias subdivisiones más en lugar de las tres esperadas. Mientras que los aislados en el occidente de África resultaron ser relativamente homogéneos, los aislados en el oriente de África a partir de seres humanos y animales no se conformaron simplemente a lo que aún se llama *T. b. rhodesiense* y *T. brucei brucei*, sino que mostraron una compleja relación con evidencia de intercambio genético en el vector, hasta ahora no determinado (Barrett *et al.*, 2003).

El género *Trypanosoma* se considera un grupo monofilético, compartiendo un ancestro común que data de hace unos 100 millones de años (Barrett *et al.*, 2003; Stevens y Gibson, 1999). La clasificación establecida por Hoare se basó en la morfología y el desarrollo en el vector del parásito (Hoare *et al.*, 1972). Las especies de *Trypanosoma* que infectan mamíferos se separaron en dos secciones: Salivaria y Stercoraria. Los tripanosomas de la sección Salivaria se subdividieron en cuatro subgéneros: *Trypanozoon*, *Duttonella*, *Nannomonas* y *Pycnomonas*. El subgénero Stercoraria comprendía tres subgéneros: *Schizotrypanum*, *Megatrypanum* y *Herpetosoma* (Vickerman *et al.*, 1976). Como algunos de estos grupos son polifiléticos y carecen de relevancia evolutiva y taxonómica, determinados autores han sugerido, más recientemente, clasificar el género en clados filogenéticos basado en el análisis de la subunidad pequeña del ARN ribosomal (SSU-rRNA) y el gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa glicosomal (gGAPDH) (Simpson *et al.*, 2006; Stevens *et al.*, 2008; Stevens y Gibson, 1999; Stevens y Rambaut, 2001). A pesar de la información proporcionada por el análisis de secuencia de ADN, la filogenia del género *Trypanosoma* y sus relaciones evolutivas no han sido firmemente establecidas (Hughes y Piontkivska, 2003; Kelly *et al.*, 2014; Votýpka *et al.*, 2015). Recientemente, Fraga *et al.*, 2016 realizaron el análisis filogenético del género *Trypanosoma* basado en el análisis de las secuencias del gen

que codifica la proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70) combinado con otros marcadores genéticos. Este estudio apoyó la clasificación de las especies de *Trypanosoma* en clados en lugar de en secciones y subgéneros. Se reconocieron nueve clados: *carassi*, *congolense*, *cruzi*, *grayi*, *lewisi*, *T. rangeli*, *T. theileri*, *Trypanosoma vivax* y *Trypanozoon* (Figura 1). Dentro del clado *Trypanozoon* se incluyen las especies *T. brucei* (*T. b. brucei*, *T. brucei gambiense*, *T. b. rhodesiense*), *T. equiperdum* y *T. evansi*. Estos resultados resultaron consistentes con el conocimiento actual de la filogenia del género.

3.2. Parásitos

La Tripanosomiasis africana humana es causada por una especie de protozoo perteneciente al género *Trypanosoma* especie *brucei* con tres subespecies:

- *Trypanosoma brucei gambiense*: que causa la tripanosomiasis crónica de inicio lento.
- *Trypanosoma brucei rhodesiense*: que causa la tripanosomiasis aguda de inicio rápido.
- *Trypanosoma brucei brucei*: que causa la tripanosomiasis animal africana (o nagana),

Estos protozoos unicelulares tienen alrededor de 20 µm de largo y 1-3 µm de ancho y se mueven constantemente con la ayuda de un flagelo unido al cuerpo celular. El nombre del orden se lo da el kinetoplasto (genoma mitocondrial del parásito), que está localizado en el región posterior de la célula, cerca del cuerpo basal, una estructura formada por microtúbulos localizado en la base del flagelo (Fenn y Matthews, 2007).

3.3. Ciclo de vida del parásito

Durante su ciclo de vida (Figura 2), *T. brucei* alterna entre un insecto vector (mosca tse-tsé) y un hospedador mamífero. El parásito permanece extracelular y se somete a importantes adaptaciones metabólicas que se reflejan en cambios morfológicos.

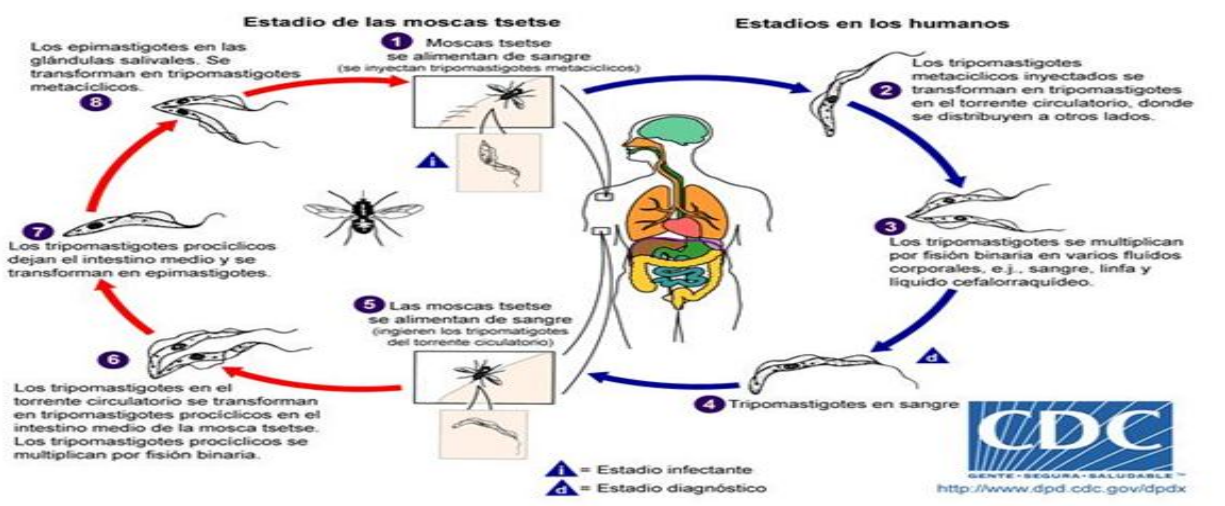


Figura 2. Diagrama representando el ciclo de vida de *Trypanosoma brucei* en la mosca tse-tsé y en humanos. Imagen tomada de Alexander J. da Silva y Melanie Moser, Biblioteca de Imágenes del Centro de Salud Pública para el Control de Enfermedades.

Con la picadura de la mosca tse-tsé infectada, se inyectan los tripomastigotes metacíclicos (Figura 3) en el tejido de la piel del hospedero humano o animal que (1) penetran en el sistema linfático y pasan al torrente sanguíneo. Dentro del hospedador (2), en la sangre y los tejidos de los mamíferos, los tripomastigotes metacíclicos, no proliferativo (3), presentan un cuerpo basal que es posterior al núcleo, con un flagelo largo conectado a lo largo del cuerpo celular (4) de 15 – 40 μm de largo (aproximadamente tres veces el diámetro de un eritrocito humano) y 2 - 5 μm de ancho, con una forma curva en S o C, membrana ondulante completa, kinetoplasto poco marcado y se caracterizan por su movimiento, retorciéndose (DPD-CDC 2006).

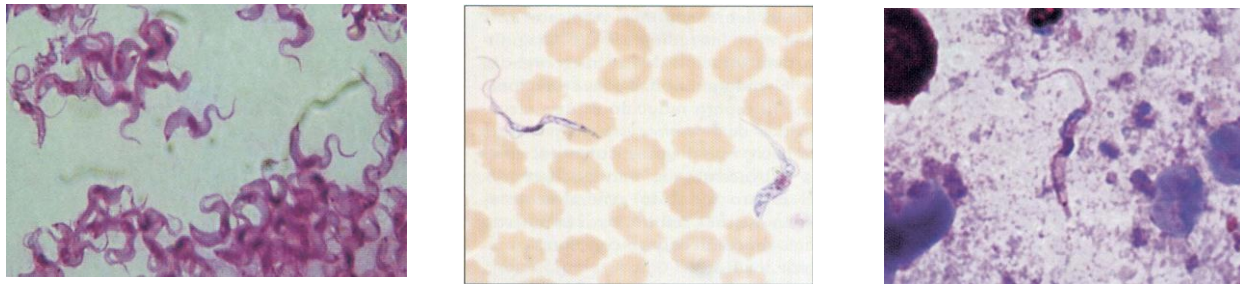


Figura 3. Tripomastigotes metacíclicos. (A) en una muestra de saliva de mosca tse-tsé, (B) en la sangre humana (C) en el líquido aspirado en un ganglio linfático. Imagen tomada de Alexander J. da Silva y Melanie Moser, Biblioteca de Imágenes del Centro de Salud Pública para el Control de Enfermedades.

Debido a la enorme diferencia entre ambos hospedadores, *Trypanosoma* sufre importantes cambios morfológicos y metabólicos que permiten al parásito adaptarse rápidamente a nuevos entornos tan diferentes como lo son la sangre de un hospedador mamífero y el tracto digestivo de la mosca tse-tsé. Además, son capaces de alternar entre formas proliferativas y no proliferativas dentro de un mismo hospedador (Mugnier *et al.*, 2016).

En la sangre del mamífero, el tripomastigote metacíclico se transforma en una forma proliferativa denominada forma sanguínea esbelta (slender del inglés). Estas células

expresan una capa protectora compuesta de dímeros idénticos de glicoproteínas de superficie variables (VSGs) ancladas por glicosilinositol fosfato (GPI), que les permite evadir la respuesta inmune a través de la llamada variación antigénica (McCulloch *et al.*, 2004). Esta variación protege la membrana contra ataques inmunológicos innatos, tal como el complemento. Estas glicoproteínas altamente inmunogénicas inducen una respuesta de anticuerpos específica que desencadena la destrucción de todos los anticuerpos opsonizados. Para sobrevivir la respuesta inmune mediada por anticuerpos, *Trypanosoma* desarrolla una variación antigénica, por lo que la capa de glicoproteína es reemplazada por una cobertura antigénicamente diferente. Se estima que entre 1×10^{-3} y 1×10^{-6} cambios antigénicos se producen mientras ocurre la duplicación de la población dentro del hospedador mamífero (Mugnier *et al.*, 2016).

La interacción entre la respuesta inmune del hospedador y la variación antigénica del parásito resulta en fluctuaciones irregulares en la parasitemia, reflejadas por fiebres intermitentes que acompañan a la destrucción de *Trypanosoma*. La infección por *T. brucei* generalmente induce activación policlonal de las células B, lo que resulta en elevadas concentraciones de IgM (hasta 14 veces los valores normales) y varios anticuerpos no específicos anti-*Trypanosoma*, entre los que se incluyen auto-anticuerpos. Estos anticuerpos, tanto específicos como no específicos, participan en la patogenia de la infección y causan reacciones inespecíficas en las pruebas de detección anticuerpo frente a otras infecciones (Lejon *et al.*, 2010).

A medida que incrementa el número de parásitos en sangre, va ocurriendo una diferenciación a una forma no proliferativa, más gruesa y con un flagelo más corto, denominada forma corta (stumpy del inglés) forma no proliferativa pre-adaptada a la mosca tse-tsé. La acumulación de células no proliferativas limita el crecimiento del número de parásitos, alargando la vida del hospedador (y por tanto, la probabilidad de transmisión de la enfermedad). Las formas parasitarias sanguíneas stumpy están metabólicamente preadaptadas a la fuente de energía que encontrarán en la mosca tse-tsé, alargando su mitocondria y expresando enzimas del ciclo de los ácidos cítricos y de la cadena respiratoria

que están ausentes en los tripanosomas sanguíneos slender (Priest y Hajduk, 1994). Además, poseen la capacidad de diferenciarse rápidamente a *Tripanosomas* procíclicos proliferativos en el tracto digestivo de la mosca, algo esencial para una transmisión efectiva y el establecimiento eficaz de la infección en el vector (Vickerman *et al.*, 1985).

Después de varios días de multiplicación local, la forma diseminada va a varios órganos y tejidos periféricos. Los parásitos luego invaden el encéfalo, donde se desencadenan inflamación local y daño neurológico (Kristensson *et al.*, 2013). El parásito viaja a través del huésped mamífero en un ambiente regulado por complejas y diversas reacciones inmunológicas, algunas de las cuales son patológicas e inducidas por componentes del parásito y la saliva de la mosca tse-tsé (Stijlemans *et al.*, 2016).

La mosca tse-tsé se infecta con los tripomastigotes presentes en la sangre del mamífero hospedador infectado. En el estómago de la mosca, se produce todo un proceso de transformación del parásito pasando de tripomastigotes a epimastigotes. Estos últimos, alcanzan las glándulas salivales de la mosca y continúan su multiplicación binaria. El cuerpo basal se encuentra en posición anterior al núcleo, con un flagelo largo conectado a lo largo del cuerpo celular. El epimastigote tiene un largo de 20 – 40 µm, forma algo curvada, membrana ondulante parcial, kinetoplasto poco marcado y es la forma de multiplicación en el vector. En las glándulas salivales se transforman en tripomastigotes metacíclicos que constituyen la forma infectante al hospedero humano (Vickerman, 1985, Simarro *et al.*, 2014).

El parásito depende de moscas tse-tsé para su ciclo de transmisión. Ambos sexos son hematófagos y pueden transmitir *Trypanosoma*. Las moscas tse-tsé son vivíparas, la hembra deposita una larva desarrollada que se adentra en el suelo y emerge como una mosca adulta un mes después. Las 31 especies y subespecies de moscas tse-tsé se clasifican como bosque, ribereño, o sabana, según las diferencias morfológicas y preferencia de hábitat (Cecchi *et al.*, 2008). *Glossina fuscipes* y *Glossina palpalis* (del grupo del río Palpalis) son los principales vectores de *T. b.gambiense* (Grébaut *et al.*, 2016) para *T. b. rhodesiense*, los principales vectores son *G. f. fuscipes* (en Uganda) y las especies de sabana, que incluyen

Glossina morsitans y *Glossina pallidipes* (Shereni *et al.*, 2016). La picadura es dolorosa y ocurre durante el día. Una vez ingerido, los *Tripanosomas* emprenden un viaje complejo a través de los tejidos de la mosca, hasta que lleguen a las glándulas salivales y se transforman en las formas metacíclicas infecciosas humanas, que se mueven libremente y tienen una forma acTAHada (Ooi y Bastin, 2013). En una población natural de mosca tse-tsé, solo una pequeña proporción (alrededor de 0,01%) lleva una infección madura de *T. brucei* (es decir, con tripanosomas metacíclicos en las glándulas salivales (Auty *et al.*, 2012). Sin embargo, la mosca tse-tsé se alimenta cada tres días y puede infectar a varias personas durante 2 - 3 meses de su vida. Eliminar las moscas tse-tsé o reducir el contacto entre la mosca tse-tsé y los seres humanos puede ser una forma de reducir o interrumpir la transmisión de *T. brucei*. Los humanos son el reservorio principal de *T. b. gambiense*, y los animales de caza son el reservorio principal de *T. b. rhodesiense* (Rotureau y Van Den Abbeele, 2013, Bonnet *et al.*, 2015).

3.4. Vías de transmisión

La enfermedad se transmite principalmente por la picadura de una mosca tse-tsé infectada con *T. brucei gambiense*, también se puede transmitir congénitamente (Lindner y Priotto, 2010; Lestrade-Carluer *et al.*, 2016). Otras rutas de transmisión son posibles pero aún no están bien documentadas y se cree que son muy raras (sexual, accidentes de laboratorio, transfusión de sangre y trasplante de órganos) (Hira y Hussein, 1979; Herwaldt *et al.*, 2001; Rocha *et al.*, 2004; Mulumba *et al.*, 2005).

La transmisión mecánica por intermedio de otros insectos hematófagos es posible; no obstante, es difícil determinar las consecuencias epidemiológicas por esta vía. Todos los grupos de edades y ambos sexos están en riesgo de infectarse, aunque la prevalencia es mayor en adultos. La distribución de la enfermedad varía por sexo según las actividades en riesgo específicas de género: la caza es predominantemente masculina y la pesca o recolección de agua es predominantemente femenina (Njiokou *et al.*, 2010; Bilonda, *et al.*, 2015).

3.5. Epidemiología

A principios del siglo XX, ocurrieron epidemias devastadoras en varios lugares, entre ellos Uganda, Congo Free State (ahora República Democrática del Congo), Camerún y otros países de África occidental (Figura 4) (Franco *et al.*, 2017). Estas epidemias probablemente se desencadenaron por perturbaciones ecológicas y movimientos forzados de población. En algunas áreas endémicas, los cambios en el uso de la tierra y el clima redujeron drásticamente las poblaciones de la mosca tse-tsé y se ha interrumpido la transmisión de *T. brucei*. La TAH tuvo un resurgimiento y hoy constituye una enfermedad tropical olvidada ya sea por la inestabilidad social o política ocurridos en los países africanos. El último pico alarmante de transmisión se produjo a finales de la década de 1990. Se requieren de esfuerzos coordinados y robustos para controlar la enfermedad (Lyons *et al.*, 1992).

En 2016, fueron informados a la OMS 2 184 casos de TAH, de los cuales 2 131 fueron causados por *T. b.gambiense* (reducción del 92,4% desde 1999) y 53 por *T. b. rhodesiense* (reducción del 91,4% desde 1999). Estas cifras incluyen casos diagnosticados tanto en países endémicos como no endémicos. La mayor parte de la carga de casos de la enfermedad por *T. b.gambiense* continúa en la República Democrática del Congo (86% de los casos), seguido por la República Centroafricana y Chad (5% y 2%, respectivamente). Sin embargo, se debe tener en cuenta la posible subdetección de casos cuando se evalúa la incidencia informada. La carga de los casos de la enfermedad por *T. b. rhodesiense* se concentra en Malawi y Uganda (82%) (OMS, 2017).

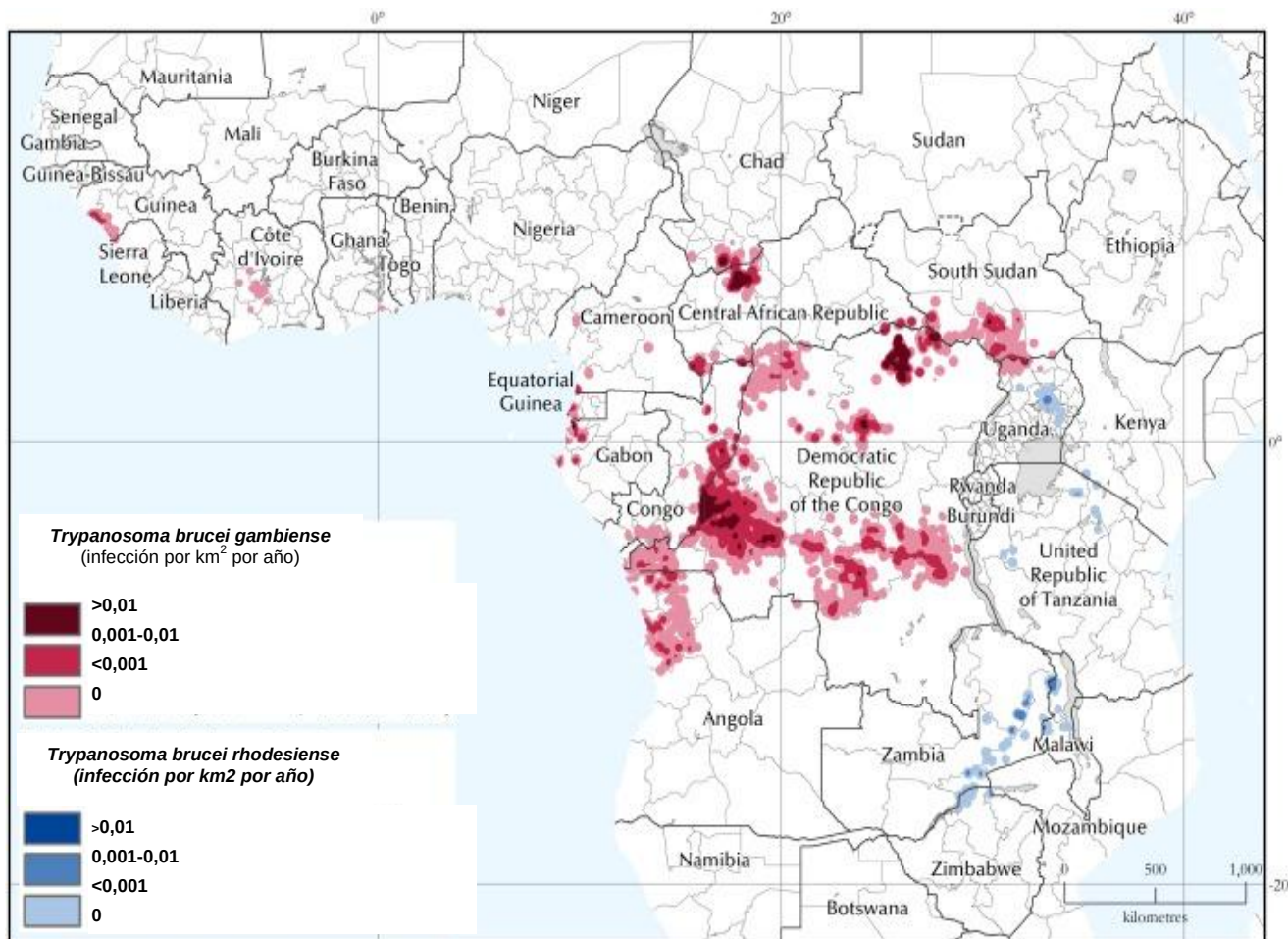


Figura 4. Distribución geográfica de los casos de TAH reportados en África (período de reporte 2010–14). Fuente: Atlas de TAH, Franco *et al.*, 2017

La enfermedad se encuentra generalmente en las zonas rurales con hábitats adecuados para el vector y el contacto frecuente entre la mosca y el humano. Las áreas periurbanas también pueden verse afectadas, especialmente donde las especies de mosca tse-tsé fluviales se han adaptado a ambientes antrópicos (Bilonda *et al.*, 2015). Las personas pueden infectarse mientras trabajan en la agricultura, la pesca, la caza, la recolección de agua o madera, o participando en cualquier otra actividad que los expone a la picadura de una mosca tse-tsé infectada.

Casos importados de TAH han sido reportados en todos los continentes. La mayoría de ellos por *T. b. rhodesiense* y se destacan turistas que han visitado parques nacionales y reservas de caza en Tanzania, pero también en Kenia, Malawi, Uganda, Zambia y Zimbabwe. Los

casos importados de enfermedad por *T. b.gambiense* son más raros, e incluyen a los migrantes, refugiados y personas que han vivido por largos periodos de tiempo en los países endémicos (Migchelsen *et al.*, 2011; Simarro *et al.*, 2012; Neuberger *et al.*, 2014). Períodos excepcionalmente largos (de 30 años, y posiblemente más) pueden separar la infección y el diagnóstico (Sudarshi *et al.*, 2014) por lo tanto, la enfermedad por *T. b.gambiense* debe ser considerada en el diagnóstico diferencial en todas las personas que alguna vez han estado en países endémicos.

3.6. Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad se van instalando de modo progresivo semanas después de la picadura del vector. La presentación clínica de la TAH depende de la subespecie *T. brucei*, la respuesta del huésped y la etapa de la enfermedad. Se ha demostrado además variaciones de virulencia y patogenicidad, que se atribuyen a diferentes cepas del parásito (MacLean *et al.*, 2010). En general, ambas formas de la enfermedad conducen a muerte si no se tratan; aunque, para la enfermedad causada por *T. brucei gambiense*, han sido descrito portadores sanos y autocuración (Jamonneau *et al.*, 2012).

La enfermedad causada por *T. b. rhodesiense* es típicamente aguda, progresando a la segunda etapa de la enfermedad en pocas semanas, hasta la muerte en unos 6 meses. La enfermedad por *T. b.gambiense* sigue un curso crónico progresivo, con una duración media estimada de 3 años, aunque con alta variabilidad interpersonal (Checchi *et al.*, 2008).

La enfermedad pasa por dos etapas: una etapa hemolinfática seguida por una etapa meningoencefáltica en la que los parásitos cruzan la barrera hematoencefálica e invaden el SNC. Los cambios neurológicos, incluido trastornos del sueño, son típicos de la segunda etapa de la enfermedad; sin embargo, la mayoría de los signos y síntomas son comunes a ambas etapas (Jamonneau *et al.*, 2012).

En la primera etapa los parásitos viven en el sistema linfático y en el torrente sanguíneo. Una reacción dérmica de 3 - 4 cm en el sitio de la picadura de la mosca tse-tsé conocida como

chancro de inoculación aparece en 2 o 3 días en 5 - 26% de las personas Bantú (conjunto de pueblos de raza negra que habitan el centro y el sur de África) que contraen *T. b. rhodesiense*. Esta reacción ocurre más frecuentemente en personas de otras regiones (fuera de África) y se observa rara vez en aquellos pacientes con TAH causada por *T. b.gambiense* (Küpfer *et al.*, 2011). Durante esta etapa la enfermedad causada por *T. b.gambiense* se caracteriza por presentar predominantemente fiebre intermitente que dura de 1 a 7 día, separados por intervalos de días o meses. También se caracteriza por dolor de cabeza, prurito y linfadenopatía (principalmente cervical posterior, pero también puede ser axilar e inguinal. Otras manifestaciones con menor frecuencia son: hepatoesplenomegalia, edema, y disfunción endocrina (amenorrea, infertilidad y aborto involuntario en mujeres) y la impotencia en hombres (Blum *et al.*, 2006).

En la segunda etapa de la enfermedad se presentan trastornos neuropsiquiátricos que acompañan los síntomas y signos de la primera etapa, y la fiebre se vuelve menos frecuente. El trastorno del sueño es característico y del cual recibe el nombre común de la enfermedad del sueño. Este consiste en somnolencia diurna, un sueño abrumador repentino y el insomnio nocturno. Los registros polisomnográficos muestran una interrupción del ciclo de sueño-vigilia con episodios de movimientos oculares frecuentes y cortos en el inicio del sueño que ocurren igualmente durante el día y la noche (Njamnshi *et al.*, 2012). Otros signos neurológicos incluyen: hipertonia o hipotonicidad; temblor de manos y dedos; movimientos oscilatorios de las extremidades o tronco; debilidad motriz, ataxia y trastornos del habla. Se observan además con frecuencia reflejos periorales. Los cambios mentales son comunes e incluyen labilidad emocional, déficit de atención, indiferencia, apatía, comportamiento agresivo, comportamiento estereotípico, fuga disociativa, episodios maníacos, melancolía, confusión y demencia. Los síntomas neuropsiquiátricos aumentan en frecuencia y severidad con la progresión de la enfermedad (Blum *et al.*, 2006). La infiltración del parásito en órganos endocrinos (principalmente tiroides y suprarrenales) y al eje hipotalámico-hipofisario conduce a la interrupción de ritmos circadianos de secreción hormonal, que incluyen prolactina, renina, hormona del crecimiento y cortisol (Buguet *et al.*, 2001), pero generalmente no requieren un tratamiento específico. Las alteraciones cardíacas son comunes pero no tienen

la misma relevancia clínica como en la enfermedad de Chagas. Las alteraciones cardíacas se desarrollan tempranamente, con cambios del electrocardiograma consistentes con perimiocarditis (prolongación del intervalo QT, cambios de repolarización y bajo voltaje) (Blum *et al.*, 2009). En la enfermedad por *T. brucei gambiense*, estas alteraciones son generalmente leves, sin embargo en la enfermedad por *T. b. rhodesiense* se reportan más temprano y aumenta de manera más severa la perimiocarditis y la insuficiencia cardíaca congestiva (Blum *et al.*, 2009).

Las características clínicas de la enfermedad por *T. b. rhodesiense* son similares a los de la enfermedad por *T. brucei gambiense*, pero el chancro tripanosomal ocurre con mayor frecuencia, a menudo con linfadenopatía satelital. La fiebre se presenta en ambas etapas de la enfermedad y con mayor frecuencia en niños que adultos (Kato *et al.*, 2015). Los ganglios linfáticos agrandados tienden a ser los submandibulares, axilares e inguinal en la enfermedad por *T. b. rhodesiense*, en lugar de cervical posterior como en la enfermedad por *T. brucei gambiense*. Además, el edema se informa con más frecuencia en la enfermedad por *T. b. rhodesiense*. La disfunción tiroidea, insuficiencia suprarrenal e hipogonadismo son más comunes en la enfermedad por *T. b. gambiense* y la miocarditis es más grave y puede ser fatal. El compromiso hepático con hepatomegalia e ictericia son frecuentes pero usualmente moderadas, a veces con ascitis y generalmente ocurren con menos frecuencia en la enfermedad por *T. b. gambiense* (Kouchner *et al.*, 1979). En los países del sudeste de África, en particular Malawi, se han reportado las formas más crónicas de la enfermedad. La misma tiene una primera etapa más larga, con menos trastornos neurológicos y ausencia de chancro (MacLean *et al.*, 2010).

3.7. Diagnóstico

Los signos y síntomas clínicos de TAH son inespecíficos y se confunden fácilmente con los de otras enfermedades. Estos pueden sugerir TAH, pero son insuficientes para el diagnóstico. El diagnóstico de la TAH tiene tres momentos: la detección serológica de la presencia de anticuerpos específicos, que determinan los casos sospechosos y así la

subespecie del parásito. Los métodos de diagnóstico empleados para la TAH se pueden clasificar en métodos serológicos, parasitológicos y moleculares.

3.7.1. Diagnóstico serológico

Las pruebas de serodiagnóstico confiables existen solo para la detección de la enfermedad por *T. b.gambiense* y se basan en la detección de anticuerpos específicos. El método más comúnmente empleado en el diagnóstico de la TAH es la prueba de aglutinación directa denominada Prueba de Aglutinación en Tarjeta para Tripanosomas (CATT, siglas en inglés). Esta técnica se desarrolló en 1977 y ha sido fundamental en el control de la TAH. La misma, se basa en la detección de anticuerpos mediante la aglutinación y muestra el resultado en cinco minutos. Además, se realiza con sangre, plasma o suero a través del pinchazo en el dedo (Magnus *et al.*, 1978, Chenchi *et al.*, 2011). Es particularmente adecuado para la detección de poblaciones en riesgo por equipos móviles (Lejon y Büsher, 2013). No obstante, la técnica del CATT presenta una baja sensibilidad y resultados equívocos para *T. b. rhodesiense* (Brun *et al.*, 2010).

Recientemente, se han desarrollado e introducido otras pruebas de diagnóstico rápido para *T. brucei gambiense*: el TAH Sero-K-SeT (Coris BioConcept, Bélgica) y el SD Bioline TAH 1.0 (Diagnostic Standard, Corea del Sur) (Bisser *et al.*, 2016). La principal ventaja, sobre la técnica de CATT, es que son pruebas que cumplen completamente con ser una técnica denominada "ASSURED" (Asequible, Sensible, Específica, Fácil de usar, Rápida y Robusto, libre de equipo y se puede entregar a los usuarios finales) (Peeling *et al.*, 2006). Por lo tanto, son más adecuadas para la detección pasiva y la vigilancia en centros de salud fijos en países endémicos, que a menudo carecen de electricidad e infraestructura de laboratorio (Jamonneau y Bucheton, 2014). Aunque estas técnicas son útiles para el tamizaje de poblaciones en riesgo y en la identificación de individuos probablemente infectados con *T. brucei gambiense*, la técnica CATT y las pruebas de diagnóstico rápido no son 100% específicas (Jammoneau *et al.*, 2015). Particularmente, cuando la prevalencia de la enfermedad es baja, donde su valor predictivo positivo se vuelve críticamente bajo (Zhou *et al.*, 2002). Actualmente, en la mayoría de los focos humanos de TAH, la prevalencia es muy

inferior a 0,1% y la detección serológica de las pruebas producen alrededor de 99 resultados falsos positivos para cada verdaderos positivos (Büsher *et al.*, 2017).

Los ensayos inmuno-tripanolisis y los Ensayos Inmunoenzimáticos de Fase Sólida (ELISA) son aplicables en suero, plasma y sangre seca en papel de filtro en condiciones de laboratorio (Camara *et al.*, 2014). Su alta especificidad y sensibilidad, su aplicabilidad a sangre seca en papel de filtro y la adaptabilidad a los especímenes de animales los hacen herramientas excelentes para encuestas, monitoreo post-eliminación y estudios de reservorios de animales (Kagbadouno *et al.*, 2012)

En la actualidad, no existe una prueba de serodiagnóstico aplicable para la infección por *T. b. rhodesiense*. Sin embargo, existen esfuerzos para desarrollar una segunda generación de pruebas de diagnóstico rápido capaces de detectar tanto la infección por *T. b. gambiense* como *T. b. rhodesiense*. La misma se encuentren en curso, no obstante el riesgo de reacción cruzada con anticuerpos contra *Tripanosomas* infecciosos no humanos están siempre presentes (Jamonneau y Bucheton, 2014).

3.7.2. Diagnóstico parasitológico

Los metodos para el diagnóstico parasitológico se basan en la detección del patógeno mediante microscopía en diferentes fluidos corporales, como pueden ser aspirados de ganglios linfáticos, sangre periférica o líquido cefalorraquídeo (LCR). En el caso de la gota fresca y gota gruesa, son métodos sencillos y baratos pero no son fiables debido a que analizan únicamente 5 - 10 µL de sangre. Teóricamente, solo detectarían concentraciones a partir de 5 000 tripanosomas/mL de sangre. Por otra parte, se requiere de personal altamente calificado con una vasta experiencia en el reconocimiento del parásito y los resultados van a depender absolutamente de la calidad de las muestras y del número de parásitos en las mismas (Bonnet *et al.*, 2015). Es válido destacar que la punción ganglionar y el análisis del aspirado linfático son métodos simples, baratos y rápidos que producen buenos resultados, pero la sensibilidad es limitada, principalmente en el caso de *T. b. rhodesiense* (OMS, 1983).

La confirmación parasitológica de la infección por *T. b.gambiense* se logra mediante el examen microscópico de un aspirado de ganglio linfático o por técnicas de concentración aplicadas a la sangre (técnica de centrifugación por intercambio mini-aniónico (mAECT) o microhematocrito) o en LCR (técnica de centrifugación única modificada) (Camara *et al.*, 2010). Es importante destacar que para detectar *Trypanosoma* móvil e incoloro a menor aumento (10×10, 16×10 o 10×40), el condensador del microscopio debe ajustarse para obtener la máxima luz de difracción. La sensibilidad diagnóstica de estas técnicas es de 90% como máximo (Mumba *et al.*, 2014). Para la infección por *T. b. rhodesiense*, que generalmente presenta una parasitemia más alta, la gota gruesa, o el aspirado de chancro pueden ser utilizados si las técnicas de concentración más sensibles no están disponibles.

3.7.3. Diagnóstico molecular

Las técnicas moleculares son una alternativa para el diagnóstico de la TAH. Las mismas ofrecen muchas ventajas en los casos en los que la parasitemia es baja. No obstante, su costo y su poca disponibilidad en los diferentes centros de diagnóstico de los países endémicos hacen que actualmente no puedan usarse en todos los casos (Mugasa *et al.*, 2012).

La correcta preparación de la fase preanalítica y analítica, el almacenamiento y la extracción de ácidos nucleicos son de los elementos de mayor importancia para optimizar el diagnóstico mediante las técnicas moleculares. La mayoría de las enzimas de amplificación de ácidos nucleicos son sensibles a inhibidores presentes en muestras clínicas. También, las nucleasas endógenas o exógenas pueden degradar rápidamente el ADN y el ARN en especímenes que no están almacenados adecuadamente. Finalmente, cuidadosas medidas deben tomarse para no contaminar las muestras con ADN del parásito exógeno, que puede conducir a resultados falsos positivos (Deborggraeve *et al.*, 2011).

Dado que la TAH es una enfermedad rural que ocurre lejos de los laboratorios de referencia donde se pueden realizar diagnósticos moleculares, se debe evitar la degradación del ADN o ARN durante el almacenamiento y el transporte. Para este fin, los especímenes pueden ser

secados sobre papel de filtro o mezclados con un tampón que estabilice los ácidos nucleicos. Un estudio realizado por (Mumba Ngoyi *et al.*, 2011) en dos centros de referencia del Congo mediante el empleo de métodos moleculares, los autores compararon muestras de sangre de pacientes con TAH gambiense en tampón hidrocloreuro de guanidina y ácido etilendiaminotetraacético (GE) con muestras en papel de filtro WAHTman 4. Los resultados demostraron una sensibilidad significativamente mayor, repetibilidad y reproducibilidad interlaboratorio mayor con muestras almacenadas en tampón de estabilización GE.

Los ácidos nucleicos se pueden extraer de muestras clínicas almacenadas, la mayoría de ellas basadas en la afinidad de los ácidos nucleicos a la sílice. Tanto el estuche de extracción de ADN a partir de sangre Maxwell 16 (Promega, Bélgica) y el mini QIAamp ADN (Qiagen, Alemania) han sido utilizados con éxito en estudios clínicos (Deborggraeve *et al.*, 2011; Mitashi *et al.*, 2013).

Los ensayos suelen comenzar con la amplificación de una secuencia de ADN específica del parásito dentro del genoma nuclear o kinetoplasto. La mayoría de las secuencias dianas de ADN se conservan entre el subgénero *Trypanozoon* (*T. brucei* sensu lato, *T. evansi* y *T. equiperdum*), incluyendo *Tripanosomas* que no infectan a humanos. Las dianas moleculares más validadas son las regiones específicas del ADN satelital de *Trypanozoon* (Moser *et al.*, 1989) y el gen del ARN ribosomal 18S (Deborggraeve *et al.*, 2011) para la RCP y el elemento móvil de inserción repetitiva (RIME) para la técnica de Amplificación Isotérmica de ácidos nucleicos (LAMP) (Njiru *et al.*, 2008). Actualmente, se encuentra disponible la técnica de RIME LAMP para la detección de *T. brucei* (Eiken Chemical, Tokio, Japón). Comparado con otras técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, las enzimas utilizadas en la tecnología de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP del inglés) son menos sensibles a los factores inhibidores presentes en la sangre. Se describe que un precalentamiento durante 10 minutos a 90 °C de sangre normal diluida en agua o de un parásito de tripanosoma preparado después de la lisis de los glóbulos rojos con un detergente y centrifugación es suficiente para liberar el ADN de tripanosoma antes de la reacción LAMP (Njiru *et al.*, 2008).

Aún no evaluado totalmente, pero de interés para la detección de alto rendimiento son los formatos de la RCP en tiempo real, recientemente desarrollados para ARNr 18S, la glucoproteína específica de *T. b.gambiense* y la proteína del suero asociada a la resistencia (Büscher y Deborggraeve, 2015).

La descripción más completa de la precisión del diagnóstico mediante pruebas moleculares para TAH fue presentado por (Mugasa *et al.*, 2012). Esta revisión incluye 12 estudios de evaluación de RCPs, dos de evaluación de la RCP en tiempo real (NASBA), uno de evaluación de LAMP y un estudio que compara ambos RCP y NASBA en los mismos especímenes. Los valores de sensibilidad diagnóstica de cada prueba variaron entre 82 y 100% mientras que la especificidad, fue mucho más heterogénea, con valores entre 59 y 100%. (Mitashi *et al.*, 2015) investigaron la precisión diagnóstica y la reproducibilidad del estuche comercial de detección *T. brucei*, Loopamp utilizando la incubadora LF-160 (Eiken Químico) en 142 pacientes con TAH gambiense, 111 controles endémicos y 97 casos sospechosos de TAH no confirmados provenientes de la República Democrática del Congo. La sensibilidad fue 90.2% y la especificidad 94.6%, en el mismo rango que la prueba de la RCP 18S y las pruebas parasitológicas realizadas en los mismos especímenes y no más alta que la detección de parásitos con técnica de centrifugación de intercambio anionico mAECT. Otro estudio se realizó en 134 muestras de pacientes con TAH gambiense y 94 casos no confirmados pero serológicamente positivos originarios de la República Popular Democrática del Congo. En este trabajo los autores demostraron la precisión diagnóstica, repetibilidad y reproducibilidad de la RCP en sangre recogida en papel de filtro y en tampón GE de dos laboratorios diferentes (Mumba Ngoyi *et al.*, 2014). De la misma manera, observaron que la sensibilidad promedio de la RCP (86,5%) no fue significativamente diferente de la prueba mAECT en capa leucocitaria (90,9%). Un estudio comparativo en 65 pacientes con TAH gambiense, 86 controles endémicos y 30 sospechosos de Uganda evidenciaron que la detección del ARN isotérmico mediante NASBA-oligocromatografía fue significativamente más sensible (93,9%) que la detección isotérmica de ADN con RIME LAMP (76,9%). Gonzalez-Andrade y colaboradores (2014) evaluaron el ensayo SL-RNA en sangre recogida

en Tubos PAXgene RNA (PreAnalytiX) de 36 pacientes con TAH y 49 controles de Guinea y observaron una sensibilidad diagnóstica de 92% y especificidad de 96%.

3.7.4. Proteínas de choque térmico: HSP70

Las proteínas de shock térmico (HSP) se encuentran ampliamente distribuidas en todos los organismos vivos y están entre las moléculas altamente conservadas que se conocen como las de mayor importancia: "chaperonas moleculares". Se identificaron por primera vez en células de *Drosophila melanogaster* sometidas a un rápido incremento de temperatura. Las proteínas de choque térmico se clasifican en función de su peso molecular. La mejor estudiada y la más representativa de la familia es la HSP70 (Carmelo. *et al.*, 2006). Entre las diversas funciones que presentan estas proteínas se encuentran: participar en el plegamiento, ensamblaje, localización intracelular, secreción, regulación y degradación de otras proteínas lo que les confiere una gran importancia para la vida de la célula (Mymrikov *et al.*, 2011). Debido a este hecho, las HSP se incluyen como componentes importantes en el mecanismo protector de las células ante diferentes condiciones de estrés celular (Mymrikov *et al.*, 2011). Además, existen evidencias de que las HSP juegan un papel importante en la interacción hospedero–parásito (Requena *et al.*, 2015).

3.7.5. Determinación de la etapa de la enfermedad

La determinación de la etapa en la que se encuentra la enfermedad se basa en el examen del LCR recogido por punción lumbar. Los pacientes con cinco o menos glóbulos blancos por μL y sin tripanosomas en el fluido cerebroespinal se clasifican como primera etapa, y aquellos con más de cinco glóbulos blancos por μL o tripanosomas en el LCR, como segunda etapa (OMS, 2013). Otros marcadores que se emplean para la determinación de neuroinflamación (ejemplo: IgM Intratecal y neopterina) se han propuesto para mejorar la determinación de cada etapa de la enfermedad. Sin embargo, el valor agregado de la detección de la IgM es mínimo. Por otra parte, la cuantificación de neopterina en condiciones de campo no es posible realizarla actualmente (Tiberti *et al.*, 2012).

3.8. Tratamiento

Cinco medicamentos se utilizan para el tratamiento de TAH: pentamidina y suramina para tratar la primera etapa de la enfermedad y melarsoprol, eflornitina y nifurtimox para la segunda etapa. Todos estos medicamentos son donados por los fabricantes y la OMS asegura su distribución gratuita. Los fármacos para el tratamiento de la enfermedad de la primera etapa generalmente no curan la segunda etapa de la enfermedad. Del mismo modo, los de la segunda etapa no se justifican en el tratamiento de la enfermedad de la primera etapa. Entre las posibles razones se destaca que los medicamentos de la segunda etapa deben atravesar la barrera hematoencefálica, además de ser más tóxicas y más complejo de administrar que los medicamentos de la primera etapa.

La elección del tratamiento depende del agente causal y la etapa de la enfermedad (Tabla 1).

Tabla 1. Tratamiento en función de la etapa de la enfermedad y la subespecie del parásito responsable de la TAH.

	Primera Línea	Segunda Línea
Etapas I		
<i>T. b. rhodesiense</i>	Suramin (IV) 20mg/kg Día 1,3,7,14 y 21	Pentamidina (IM)
<i>T. b. gambiense</i>	Pentamidina (IM) 4 mg/kg cada 24 h por 7 días	Suramin (IV)
Etapas II		
<i>T. b. rhodesiense</i>	Melarsoprol (IV) 2.2mg/kg día 10 dosis diarias	NO HAY DISPONIBLE
<i>T. b. gambiense</i>	Eflornitina (IV) 200mg/kg cada 12 h por 7 días + Nifurtimox (oral) 15 mg/kg por día cada 8 horas por 10 días	Melarsoprol (IV)

3.9. Situación de la Tripanosomiasis Africana Humana en países no-endémicos

En el mundo globalizado en que vivimos se han diagnosticado alrededor de 94 casos de TAH en 19 países no endémicos de la enfermedad, en su mayoría los casos de *T. b. rhodesiense* correspondieron a turistas que habían visitado estos países por corto tiempo, y los casos

diagnosticados con *T. b.gambiense* resultaron ser personas que habían vivido en los países endémicos por largos períodos de tiempo. (Simarro *et al.*, 2012).

En comparación con los africanos, los viajeros de países no endémicos presentan un período de incubación más corto (menor de tres semanas para la TAH por *T. b. rhodesiense* y menor de un mes para la enfermedad por *T. brucei gambiense*) con cuadro clínico mas agudo y febril desde el principio, independientemente de la subespecie infectante. El chancro tripanosomal se informa con mayor frecuencia (88%) en la enfermedad por *T. b. rhodesiense* que en la enfermedad por *T. b.gambiense* (56%). En un tercio de los casos se desarrolla una erupción que no pica, con máculas eritematosas irregulares de hasta 10 cm de diámetro que a menudo presenta una zona central de color normal de la piel (Urech *et al.*, 2011). Dicha erupción puede durar varias semanas, pero puede aparecer y desaparecer en diferentes áreas del cuerpo (Duggan *et al.*, 1966). Un octavo de los pacientes refieren dolor de cabeza y presentan linfadenopatía, hepatomegalia y la esplenomegalia. En viajeros con enfermedad por *T. b. rhodesiense*, los síntomas gastrointestinales son los más frecuentes, con ictericia que se ha reportado en el 28% de los casos. En estos pacientes se han presentado complicaciones menos frecuentes pero severas que incluyen insuficiencia renal que requiere hemodiálisis, fallo multiorgánico, coagulopatía intravascular diseminada y coma (Simarro *et al.*, 2012).

Algunos problemas prácticos son cruciales para el diagnóstico correcto. La demora entre la toma de la muestra y el examen diagnóstico puede producir un resultado falso negativo ya que *Tripanosomas* no sobreviven mucho tiempo después de que se toma la muestra de sangre. Además, la muestra debe enviarse al laboratorio a una temperatura de 2-8 °C, ser protegida de la luz solar y utilizada dentro de las primeras 12 horas (Chappuis *et al.*, 2005). El reconocimiento del parásito, principalmente en frotis de sangre gruesa y en aspirado de ganglios linfáticos, requiere contar con técnicos de laboratorio experimentados en observar los parásitos en extendido de los fluidos corporales. Las técnicas de centrifugación de microhematocrito, capa leucocítica cuantitativa o la técnica de centrifugación de intercambio de mini-anión solo están disponibles en laboratorios especializados. Las técnicas

moleculares tienen cierto potencial en las clínicas de viajeros. Aunque el riesgo de TAH en viajeros es bajo, no debe ser pasada por alto. Para esto es necesario que los laboratorios de referencia en países no endémicos cuenten con los métodos de diagnóstico de la enfermedad, y en específico se considera que las técnicas moleculares serían de gran utilidad en este sentido. Las pruebas serológicas no están validadas en viajeros, su sensibilidad varía de región a región y su especificidad puede ser tan baja como 61% (Blum *et al.*, 2012)

3.9.1 Situación de la Tripanosomiasis Africana Humana en Cuba

En la actualidad no existen reportes de personas con TAH en Cuba, debido a que no existe el riesgo de la transmisión vectorial. Sin embargo, desde hace años Cuba tiene y mantiene un fuerte intercambio con países africanos brindando ayuda médica y donde permanecen cubanos por largos períodos de tiempo. Además, se reciben en la isla estudiantes procedentes de países africanos en los cuales existe la enfermedad. Por este motivo se hace necesario que el país cuente con herramientas moleculares que permitan complementar el diagnóstico de la TAH al menos en el LNRP-IPK.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Tipo de estudio y contexto de la investigación

Se realizó un estudio de validación de pruebas diagnóstica con la finalidad de fortalecer la capacidad para el diagnóstico molecular de TAH en el IPK. Esta investigación es apoyada por el Instituto de Medicina Tropical de Amberes (IMT-A), Bélgica y con la colaboración de países endémicos de la enfermedad.

4.2. Universo de trabajo

El universo de trabajo estuvo integrado por ADN procedente de cepas de *Trypanosoma* spp. y otros Trypanosomatideos previamente caracterizados y que son considerados como referencia, muestras de ADN de otros microorganismos infecciosos y ADN procedente de muestras clínicas de individuos; todas las muestras se detallan a continuación (Tabla 2).

4.2.1. Cepas de referencia

Se utilizaron 15 cepas como referencia, provenientes de la Unidad de Parasitología Molecular del IMT-A, Bélgica. La clasificación de especies y los linajes se realizó de acuerdo a los métodos de análisis múltiple de enzimas mediante electroforesis (MLEE, siglas en inglés), la técnica del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD, siglas en inglés), así como la RCP-miniexon determinados en los laboratorios de los países de origen (Bosseno *et al.*, 1996; Breniere *et al.*, 1997; 1998; Bernabé *et al.*, 2000).

Tabla 2. Cepas de referencia utilizadas en el estudio.

especie	nombre de la cepa	genotipo	país de procedencia
<i>t. b. brucei</i>	antat17.1	nd	congo
	927/4 gutat10.1	nd	kenya
<i>t. brucei gambiense</i>	antat9.1	tipo 1	cameron
	abbaa	tipo 2	costa de marfil
<i>t. b. rhodesiense</i>	antat 25.1	nd	ruanda
	eatro 3	nd	uganda
<i>t. congolense</i>	ser/71/stib212	savannah	tanzania
<i>t. equiperdum</i>	940m	nd	-
<i>t. theileri</i>	t. thei	nd	-
<i>t. evansi</i>	rotat 1.2	nd	indonesia
<i>t. vivax</i>	y486	oeste de áfrica	nigeria
<i>t. lewisi</i>	ulbpu-tlewisi-1	nd	nd
<i>trypanosoma cruzi</i>		i	bolivia
	sp104		
<i>trypanosoma rangeli</i>	rpla4	nd	venezuela
<i>t. cruzi marinkellei</i>	m1009	nd	venezuela

nd. no determinado

4.2.2. ADN de otros patógenos

Se utilizó el ADN de otros protozoos patógenos provenientes del Banco de ADN del Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Parasitología del IPK: *Plasmodium falciparum*, *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/06/ICA), *L. guyanensis* (MHOM/PE/02/LH2372), *L. mexicana* (MHOM/PE/02/LH2312), *L. donovani* (MHOM/SD/--/1-S), *L. lainsoni* (MHOM/BO/95/CUM71), *L. infantum* (MHOM/FR/78/LEM75), *L. major* (MHOM/IL/67/LRC-L137), *L. tropica* (MHOM/PS/01/ISL590), *L. aethiopica* (--/KE/--/161B) con el objetivo de determinar la especificidad analítica de las RCP-ARNr 18S y RCP-hsp70.

4.2.3. Muestras clínicas

En el estudio se utilizó para la evaluación de la técnica de RCP 46 muestras clínicas humanas, de ellas 20 correspondientes a pacientes de la República Popular Democrática del Congo con diagnóstico confirmado de TAH, cinco fueron muestra de LCR y 15 de sangre. Las 26 muestras restantes fueron de pacientes con confirmación de otras enfermedades parasitarias (Toxoplasmosis y Enfermedad de Chagas).

Las muestras de ADN forman parte de un panel de muestras conformado entre el IMT y el IPK para la introducción de los métodos de RCP en el LNRIPK y se obtuvieron según los protocolos establecidos en cada uno de los laboratorios donantes. La extracción de ADN a partir de la muestra de LCR y sangre se obtuvo utilizando el estuche de extracción QIAamp ADN mini kit (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se re-suspendió en un volumen final de 50 µL, que se conservó a 4°C hasta la realización de los ensayos moleculares.

4.3. RCP-ARNr 18S y RCP-hsp70 para la detección de las subespecies de *T. brucei*.

4.3.1. Cebadores de la RCP-ARNr 18S

La RCP ARNr 18S utilizó los cebadores sintéticos específicos M18S-II-F-Tb y M18S-II-R-Tb (Tabla 3), que amplifican una región de 150 pb del ARNr 18S de *T. brucei* descrito por Deborggraeve y colaboradores (2011).

Tabla 3. Cebadores utilizados para amplificar la región específica del ARNr 18S de *T. brucei*.

RCP	Cebador	Secuencia (5' - 3')	Talla esperada (pb)	Referencia
ARNr 18 S	M18S-II-F-Tb	CGTAGTTGAACTGTGGGCCACG	150	Deborggraeve <i>et al.</i> , 2011
	M18S-II-R-Tb	ATGCATGACATGCGTG AAAGTGAG		

4.3.2. Diseño de los cebadores para la RCP-hsp70 Tb

A partir de la secuencia nucleotídica del fragmento de gen que codifica la HSP70 citoplasmática de *T. b.gambiense* correspondiente a la cepa AnTat17.1 con número de acceso al Banco de Genes (GenBank) KP208735 se diseñó un juego de cebadores utilizando el programa Primer 3 (<http://simgene.com/Primer3>) (Untergasser et al., 2012). La secuencia utilizada para diseñar los cebadores se analizó por CLUSTAL W (www.ebi.ac.uk) y BLAST 2.0 ("Herramienta de búsqueda de alineación básica") del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) para detectar la especificidad del juego de cebadores que se propondría. Además; se realizó el alineamiento de las secuencias de los cebadores propuestos para el gen hsp70 citoplasmático compuesto por 76 secuencias procedentes de 65 aislamientos de 11 especies de *Trypanosoma* (*Trypanosoma carassi*, *T. brucei*, *Trypanosoma evansi*, *T. equiperdum*, *Trypanosoma congolense*, *Trypanosoma vivax*, *Trypanosoma theileri*, *Trypanosoma grayi*, *T. lewisi*, *T. rangeli* y *T. cruzi* (Fraga et al., 2016). El diseño de juego de cebadores para *T. brucei*, se determinó teniendo en cuenta los criterios establecidos para la RCP (Abd- Elsalam, 2003). Dichos cebadores amplificaron un fragmento menor de 500pb. En una región conservada y a la vez polimórfica que permitió la detección de *T. brucei* mediante la RCP. Además, se tuvo en cuenta que los cebadores no deben ser complementarios a las especies de *Leishmania* u otros Trypanosomatídeos. Para cumplir con todas estas especificaciones técnicas el juego de cebadores se ajustó manualmente y se comprobaron las características de los mismos utilizando el programa Oligonucleotide Properties Calculator (<https://www.biosyn.com/Gizmo/Tools/Oligo/Oligonucleotide%20Properties%20Calculator.htm>). La técnica se nombró como la RCP- hsp70TbTb.

4.3.3. Normalización de la RCP basada en el gen ARNr 18S y hsp70

Se normalizaron los componentes de la reacción de amplificación de cada una de las RCPs la introducida (RCP-ARNr 18S) y la diseñada (RCP-hsp70Tb). Para ello se realizaron distintos experimentos en cada una de las RCPs. La amplificación se realizó en un volumen final de reacción de 25 µL, conformado por 2,5 µL solución amortiguadora coloreada de la RCP 1 x (CoralLoad RCP buffer, en inglés) con 1,5 mM de MgCl₂ (Qiagen, Hilden, Alemania),

5 µL de solución amortiguadora Q 1 x (Qiagen, Hilden, Alemania), 200 µM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTPs) (Eurogentec, Bélgica) y 10fg de ADN molde a amplificar (*T. brucei brucei* AnTat17.1). Se evaluaron primeramente distintas concentraciones de los componentes de la mezcla de reacción. Los componentes a evaluar fueron: concentración de los cebadores (0,4; 0,8, 1,2; 1,6; 2,0 µM) (Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba), cantidad de enzima HotStarTaqPlus ADN polimerasa (Qiagen, Hilden, Alemania) (1; 1,5; 2,0; 2,5U); concentración de MgCl₂ (1,0; 1,5; 2; 2,5; 3,0 mM) (Qiagen, Hilden, Alemania), se evaluó cada uno de manera individual y se mantuvo el resto de los parámetros constantes. Se incluyó un control negativo en cada experimento, que contuvo H₂O destilada estéril en lugar de ADN molde de *T. brucei*.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador (BIORAD T100, EUA) con el siguiente programa de amplificación: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94 °C por 40 seg, hibridación; se evaluó un gradiente de temperaturas (52,2; 52,6; 53,6; 57,3; 59,7; 62; 67,4; 68,8; 70 °C) por 1 min y extensión a 72 °C por 1 min, con una extensión final después del último ciclo a 72 °C por 10 min.

Para la detección del producto de amplificación se analizaron 15 µL de cada mezcla resultante en electroforesis en gel de agarosa 2%, preparado en tampón tris-borato-EDTA: tris-borato (0,045 mol/L), EDTA (0,001 mol/L) (TBE 0,5x) con bromuro de etidio 0,5 µg/mL. La visualización de los productos de amplificación se realizó mediante luz ultravioleta y se utilizó un sistema compacto de imágenes de geles U: Genius (Syngene, Reino Unido). Se utilizó como marcador de peso molecular Molecular Gene™ Ruler 100bp ADN ladder plus (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania).

4.3.4. Sensibilidad analítica de la RCP- ARNr 18S y hsp70

Este experimento permitió conocer el nivel de detección de parásito en cada una de las RCPs. Se realizaron diluciones seriadas (1/10) en tampón Tris-EDTA (TE) desde 10 ng hasta 10 fg, con ADN de cepas representativas de distintas especies: *T. brucei brucei* AnTat17.1; *T. b. rhodesiense* AnTat 25.1, *T. b.gambiense* AnTat9.1 (Tabla 2).

Posteriormente, se realizó la RCP siguiendo las condiciones previamente normalizadas para cada RCP en el mismo volumen final. Los productos de amplificación de todas las diluciones realizadas se observaron en una corrida electroforética en las condiciones descritas en el acápite 4.3.3.

4.3.5. Especificidad analítica de la RCP- ARNr 18S y hsp70

Para estudiar la especificidad analítica de las dos RCPs, se utilizaron como molde 10 ng de ADN de otros microorganismos previamente mencionados (acápite 4.2.2). Se realizó la reacción de amplificación de la RCP-ARNr 18S y RCP-hsp70 en las condiciones previamente normalizadas. Se utilizó como control positivo 1 µL de ADN a 0,1 ng de la cepa de referencia de *T. brucei brucei* AnTat17.1 y un control negativo al que se le adicionó agua libre de trazas, en lugar de ADN molde. El resultado se visualizó en corrida electroforética en gel de agarosa 2% (acápite 4.3.3).

4.3.6. Repetibilidad y reproducibilidad de la RCP- ARNr 18S y hsp70

Se comprobó la variabilidad intrínseca de la reacción o repetibilidad, realizando las RCPs en tres días diferentes, utilizando los mismos reactivos, equipos, procedimientos y condiciones generales y ADN de las sub-especies *T. brucei brucei* AnTat17.1; *T. b. rhodesiense* AnTat 25.1 y *T. b.gambiense* AnTat9.1. Los resultados se comprobaron mediante electroforesis según lo descrito en el acápite 4.3.3.

Se prepararon mezclas de reacción con las cantidades previamente normalizadas, utilizando como molde ADN genómico de cepas correspondientes a las tres subespecies de *T. brucei* (*T. brucei brucei* AnTat17.1; *T. b. rhodesiense* AnTat 25.1; *T. b.gambiense* AnTat9.1), para la amplificación del ARNr 18S y hsp70 en distintas condiciones, tanto en el IPK, Cuba; como en el laboratorio de Parasitología Molecular del IMT Amberes, Bélgica. Las mezclas se amplificaron en los correspondientes termocicladores de cada laboratorio y se verificaron los resultados en corridas electroforéticas realizadas según las condiciones pre-establecidas en cada uno (acápite 4.3.3).

4.3.7. Evaluación de la validez diagnóstica de las RCP-ARNr 18S y la RCP-hsp70 para la detección de *T. brucei* en muestras clínicas

Se realizó la detección de *T. brucei* en un panel de ADN obtenido a partir de muestras clínicas de pacientes mediante la RCP-ARNr 18S y la RCP-hsp70 en las condiciones previamente normalizadas con el fin de comprobar el valor diagnóstico de cada una de las RCPs. La validez de cada método se evaluó a partir de la determinación de la sensibilidad y especificidad diagnóstica (Altman y Bland, 1994). Para determinar la validez diagnóstica se utilizaró el programa EPIDAT 3.1 (2006). Para este análisis, se utilizó una tabla de contingencia de 2x2. En la misma se enfrentó el resultado de cada una de las RCPs (en filas), con el resultado de la prueba de referencia (en columnas). La prueba de referencia se basó en la confirmación del parásito a través del examen microscópico.

4.4. Procesamiento estadístico

Se determinó la concordancia de los métodos de las RCPs (RCP-ARNr 18S y RCP-hsp70Tb) utilizados entre sí, a partir del índice de kappa de Cohen's (Cohen, 1960) calculado mediante el programa Epidat 3.1 (Dirección Xeral de Saude Pública, Organización Panamericana de la Salud, Galicia, España). Para la interpretación de la concordancia entre los métodos se utilizó la escala de valoración propuesta por Landis y Koch (1977): 0: sin acuerdo; 0,01-0,20: insignificante; 0,21-0,40: baja; 0,41-0,60 moderada; 0,61-0,80: buena; 0,81-1,00: excelente.

4.5. Consideraciones Éticas

Esta investigación constituye una de las tareas del Proyecto "**Desarrollo de capacidades para el diagnóstico molecular de la Tripanosomiasis Americana y Africana en el Laboratorio Nacional de Referencia de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"**". El proyecto fue evaluado y aprobado para su ejecución por el Comité de Ética Institucional del IPK (CEI-IPK-03-13). Las muestras clínicas forman parte del banco de muestras de la Unidad de Parasitología Molecular del IMT Amberes en Bélgica y del LNRP-IPK, Cuba. En cada lugar de procedencia se aplicó el protocolo establecido, según las indicaciones éticas necesarias para estos casos, expresadas en la declaración de Helsinski y

de acuerdo a cada Comité de Ética de cada país, donde las muestras fueron tomadas con un consentimiento informado que expresa que podrán ser utilizadas para estudios moleculares.

5. RESULTADOS

5.1. Diseño de los cebadores para la RCP-hsp70 Tb

Se diseñó un juego de cebadores a partir del alineamiento del fragmento de 1380 pb del gen que codifica la HSP70 citoplasmática de especies de *Trypanosoma*. El juego de cebadores que se muestra en la Tabla 4 amplifica una región de 141pb para todas las especies del grupo *Trypanozoon*, y no son complementarios a otras especies de *Trypanosoma* ni otros *Trypanosomatideos* como *T. cruzi* (Figura 5).

Tabla 4. Cebadores utilizados para amplificar una región específica del gen que codifica la HSP70 citoplasmática de *T. brucei*.

RCP	Cebador	Secuencia (5´- 3´)	Talla esperada (pb)
hsp70 Tb	hsp70_Tb_F	GTCTCCTCCTTCTGGATGTCG	141
	hsp70_Tb_R	CGGGCTGATTGTCTGAGTATGTG	

5'- GTCTCCTCCTTCTGGATGTCG- 3'

5'- CGGGCTGATTGTCTGAGTATGTG- 3'

hsp70 Tb-F

hsp70 Tb-R

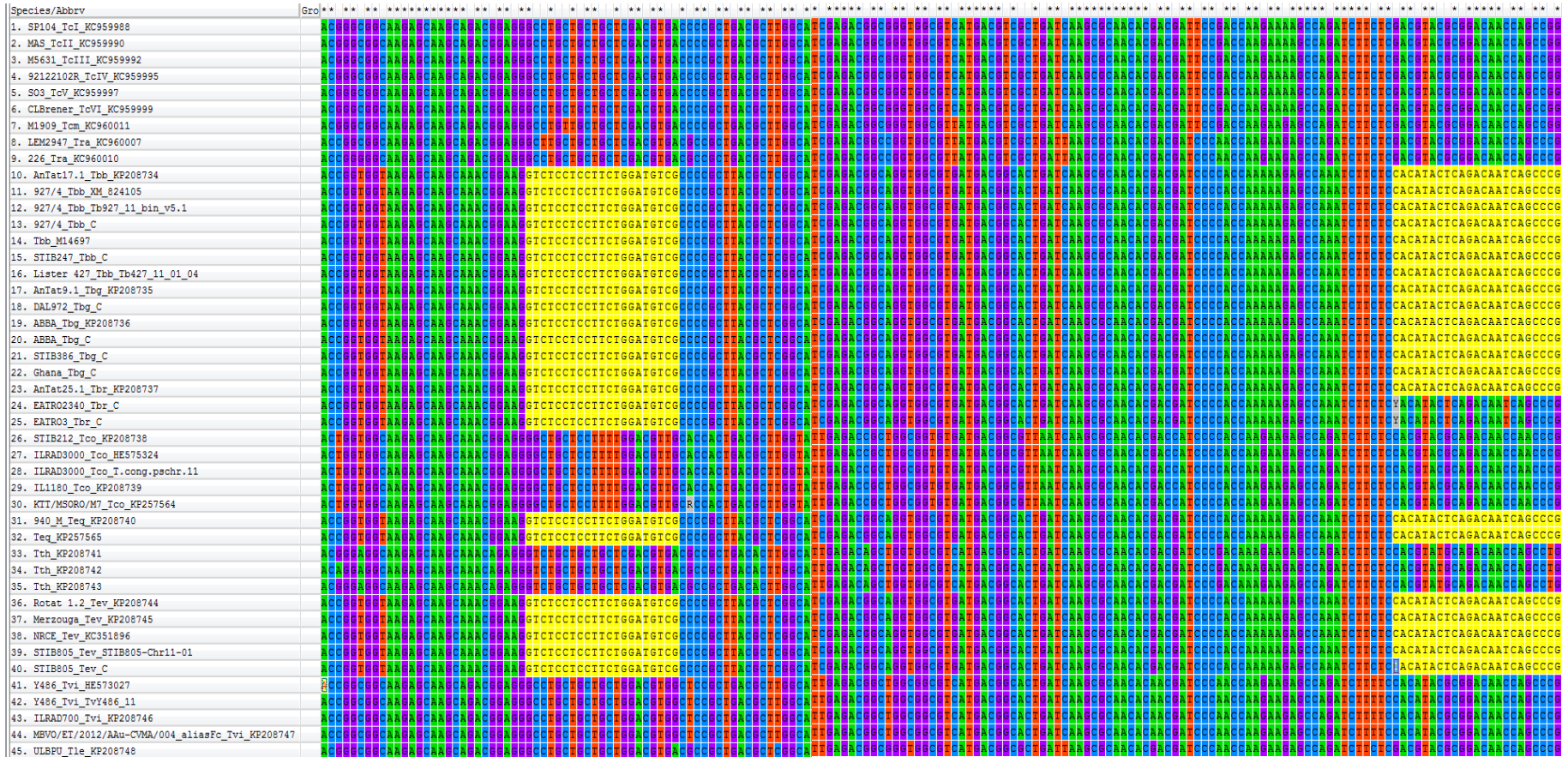
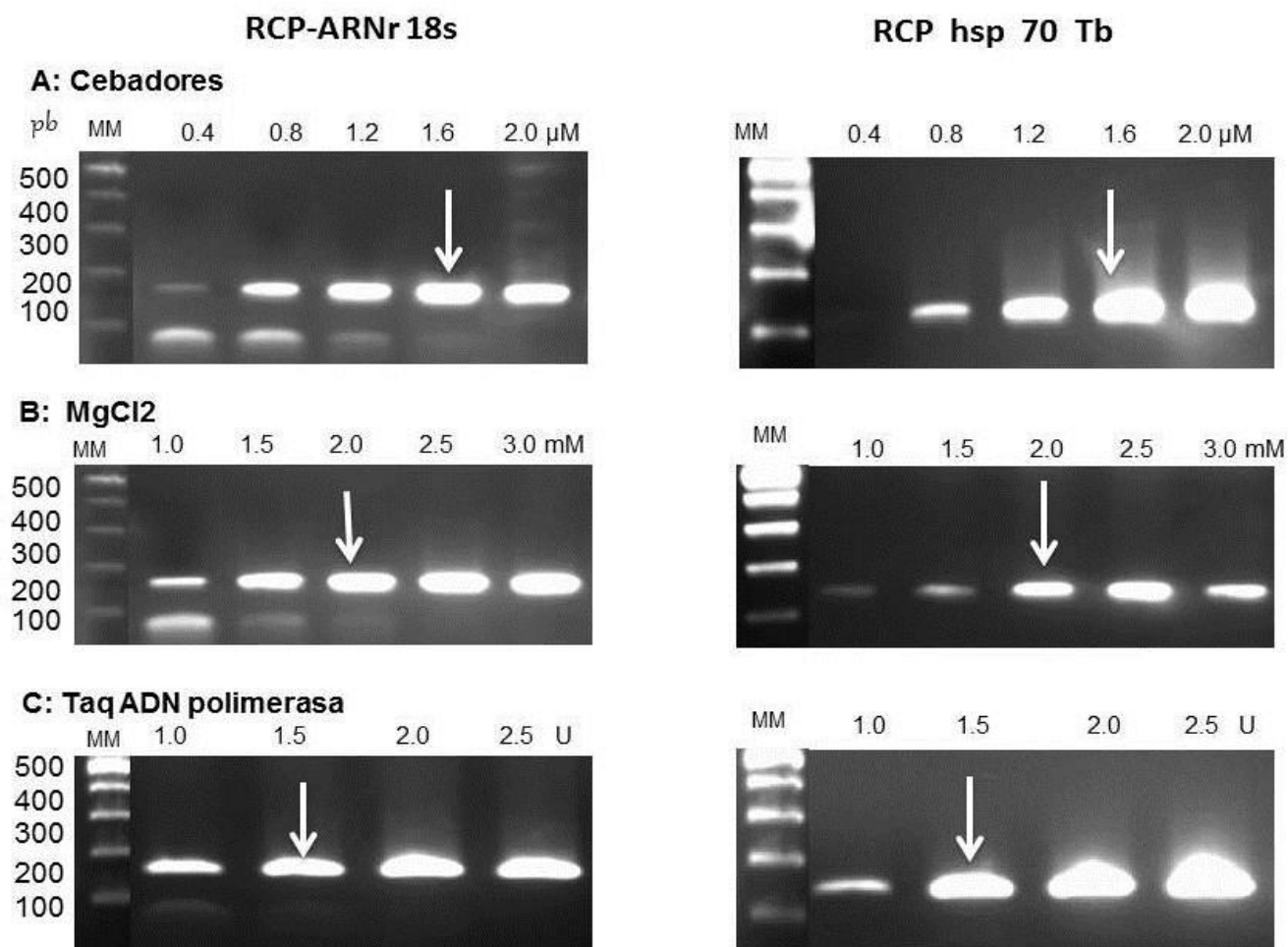


Figura 5. Ubicación del juego de cebadores diseñados en el alineamiento del fragmento de 1380pb del gen que codifica la HSP70 citoplasmática entre especies de *Trypanosoma*. Sombreado la región que corresponde a cada uno de los cebadores en un sentido (F) y en sentido contrario (R).

5.2. Normalización de la RCP basada en el gen ARNr 18S y hsp70

Para proceder a la normalización de cada uno de los protocolos, se determinaron las condiciones óptimas de algunos de los componentes de la mezcla de reacción (concentración de cebadores, $MgCl_2$ y Taq ADN polimerasa). En todos estos casos se mantuvo constante en la mezcla de reacción la cantidad de dNTPs, tampón de amplificación y las condiciones en el termociclador. La figura 6 (A, B y C) muestra el patrón de amplificación en cada caso según los diferentes protocolos; las concentraciones óptimas se midieron por la intensidad de las bandas y aparecen señaladas con flechas. De igual forma se probaron diferentes temperaturas de hibridación manteniendo constantes los componentes de la mezcla de reacción (Figura 6 D). Los amplicones correspondieron a las tallas esperadas para cada caso y la eficiencia de la amplificación fue similar para todos los protocolos.



D: Temperatura de hibridación

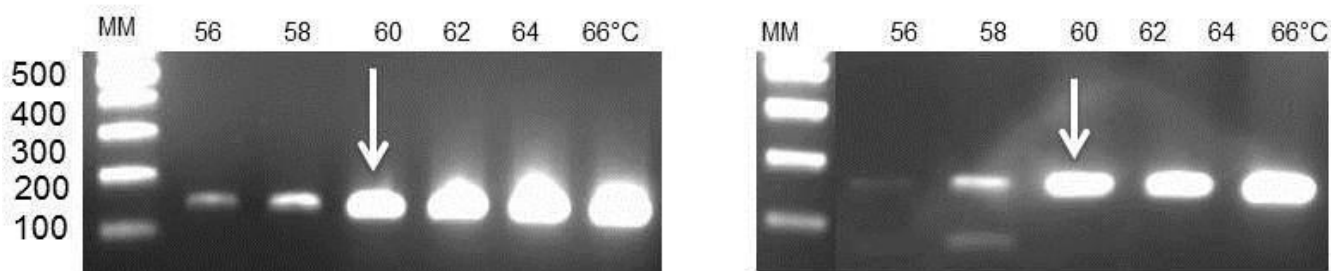


Figura 6. Patrón de amplificación obtenido al variar la concentración de los componentes de la RCP ARNr18S y hsp70Tb y la temperatura de hibridación en las condiciones en el termociclador. A) Cebadores, B) $MgCl_2$, C) Taq ADN polimerasa, D) temperatura de hibridación. Las concentraciones de los componentes de la reacción y la temperatura evaluadas aparecen especificadas en cada carril. MM: Marcador de Peso Molecular, Molecular Gene™ Ruler 100bp ADN ladder plus (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania). La flecha indica la condición óptima en cada caso.

En la Figura 6A se aprecian los patrones de amplificación al variar las concentraciones de cebador desde $0,4\mu M$ hasta $2\mu M$ para ambos ensayos. Al utilizar $0,4\mu M$ la banda esperada aparece de forma muy tenue. A partir de $0,8\mu M$ aumenta la intensidad de la banda con respecto a la primera concentración, y se mantiene aumentando en la medida que lo hace la concentración del cebador. Asumimos como concentración óptima $1,6\mu M$ para cada RCP, al observarse mayor intensidad con la menor cantidad de cebador a utilizar.

En la Figura 6B se aprecia que la banda amplificada aumenta su intensidad desde $2,0mM$ hasta $2,5mM$ de $MgCl_2$ y que al incrementar la concentración hasta $3mM$ la intensidad de la banda se mantuvo constante. De ahí que consideramos $2,0mM$ como la concentración óptima del $MgCl_2$ para ambas técnicas de RCPs.

En la Figura 6C se observa como a partir de 1,0U y hasta 1,5U de la enzima Taq ADN polimerasa ocurre un aumento en la intensidad de la banda amplificada, manteniéndose constante hasta 2.5U. Se consideró como concentración óptima 1,5U en 25 µL de cada reacción donde se obtiene una banda con intensidad adecuada para las dos reacciones de la RCP.

Una vez optimizados los componentes de la mezcla de reacción de las dos RCP, se modificaron las condiciones en el termociclador, probándose diferentes temperaturas de hibridación (Figura 6D). Se consideró como temperatura óptima 60°C, para ambos ensayos, temperatura a la cual aparece una banda de amplificación con mayor intensidad.

En la Tabla 5 y 6 se resumen las condiciones óptimas de los componentes de la mezcla de reacción de la RCP-ARNr 18S y RCP-*hsp70* Tb y las condiciones óptimas en el termociclador.

Tabla 5. Condiciones óptimas de los componentes de la mezcla de la RCP-ARNr 18 S y RCP-*hsp70* Tb utilizando la cepa *T. brucei brucei* AnTat17.1 procedente de la Republica del Congo en 25µL de volumen final.

Componentes	Concentración final
MgCl ₂	2,0 mM
Cebadores	1,6 µM
Taq ADN pol	1,5 U
Tampón Taq ADN pol	1x
Q buffer	1x
dNTP	200 µM

Tabla 6. Condiciones óptimas de las condiciones de la reacción de la RCP-ARNr 18 S y RCP-*hsp70* Tb utilizando la cepa *T. brucei brucei* AnTat17.1 procedente de la Republica del Congo.

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización Inicial	95 °C	5 min	1 ciclo
Desnaturalización	94 °C	40 seg	35 ciclos
Hibridación	60 °C	1 min	
Extensión	72 °C	1 min	
Extensión final	72 °C	8 min	1 ciclo

5.3. Determinación de la sensibilidad y especificidad analíticas de las técnicas de RCP-ARNr 18S y RCP-*hsp70* Tb, así como la repetibilidad y reproducibilidad.

La sensibilidad analítica de ambas RCP se evaluaron en un panel constituido por cepas de las tres subespecies de *T. brucei*, en todos los casos se utilizaron diluciones del ADN extraído de las cepas de referencia. La RCP-ARNr 18S detectó para las tres subespecies del parásito hasta 0,01pg (10fg), última concentración en la que se observó la banda esperada, de 150pb (Figura 7).

La RCP-*hsp70*Tb fue capaz de detectar hasta 0,01pg (10fg) de parásito para las subespecies de importancia en la salud pública *T. b. rhodesiense* y *T. brucei gambiense*, última concentración en la que se observó la banda esperada, de 141pb. Sin embargo solo detecta hasta 0,1pg de *T. brucei brucei* (Figura 7).

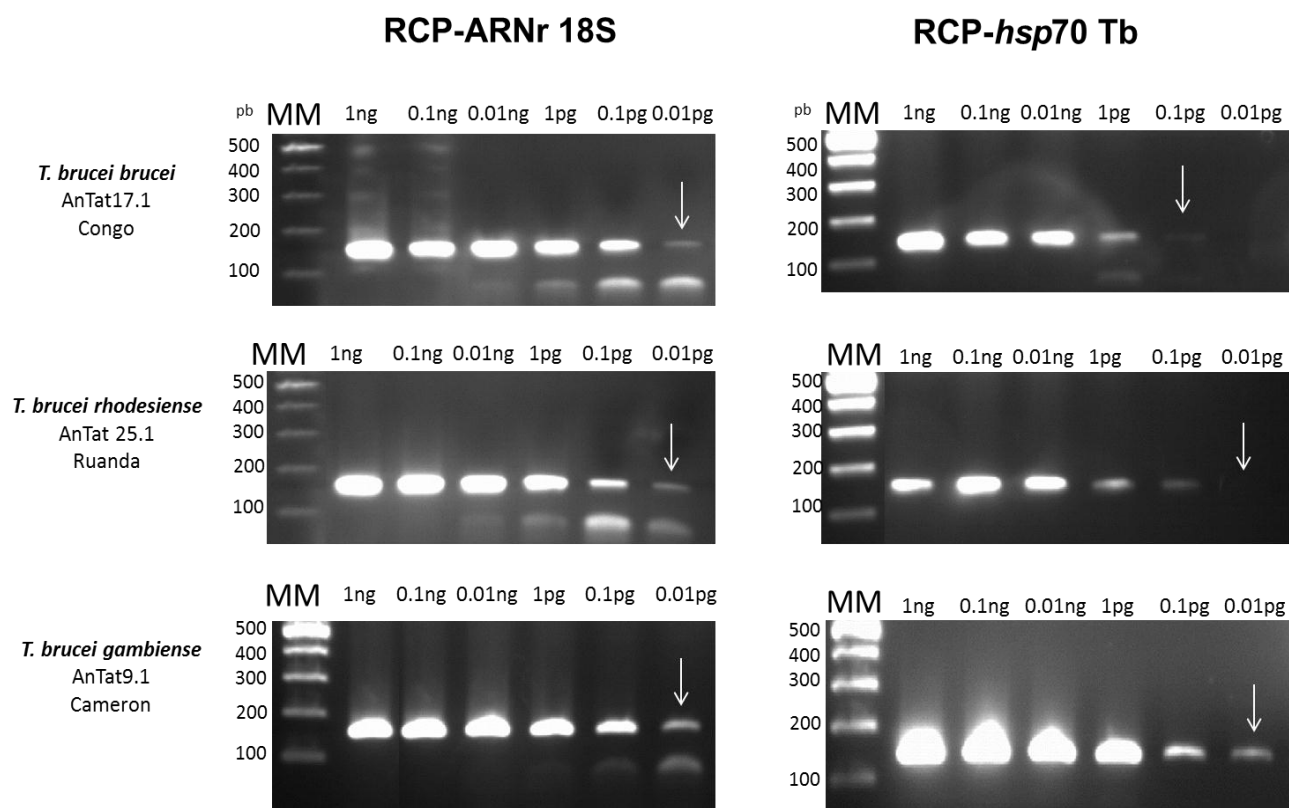
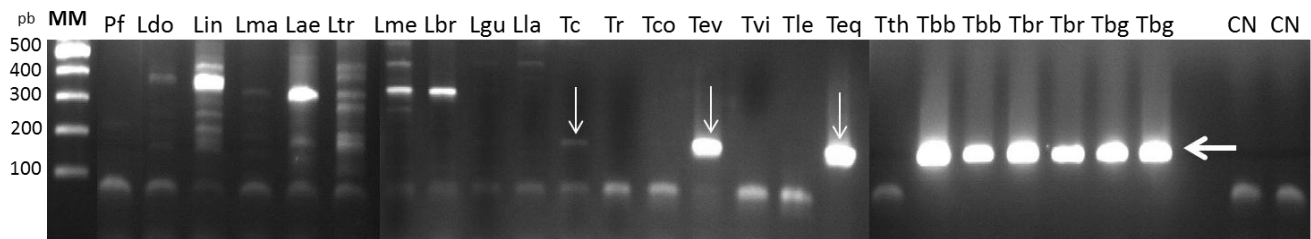


Figura 7. Sensibilidad analítica de la RCP-ARNr 18S y RCP-*hsp70*Tb. Se especifica la cepa y subespecie de *T. brucei* utilizada a la izquierda de cada gel presentado. MM: Marcador de Peso Molecular, Molecular Gene™ Ruler 100bp ADN ladder plus (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania). Las cantidades de ADN de *T. brucei* se indican en cada carril. La flecha indica las condiciones ópticas en cada caso.

En la evaluación de la especificidad analítica de cada uno de los métodos de RCP se utilizó un panel de muestras de ADN de distintos agentes infecciosos parasitarios *Plasmodium falciparum*, diferentes especies de *Leishmania* y especies de *Trypanosoma*. La RCP-ARNr 18S no solo detectó las tres subespecies de *T. brucei*, *T. evansi* y *T. equiperdum* que pertenecen todas al subgénero *Trypanozoon* sino que es capaz de detectar *T. cruzi* como se observa en la Figura 8A. La RCP-*hsp70*Tb amplificó para las subespecies de *T. brucei* igualmente para *T. evansi*, *T. equiperdum*, *T. theileri*, *T. rangeli* y *T. congolense* (Figura 8B).

A: RCP-ARNr 18S



B: RCP-*hsp70* Tb

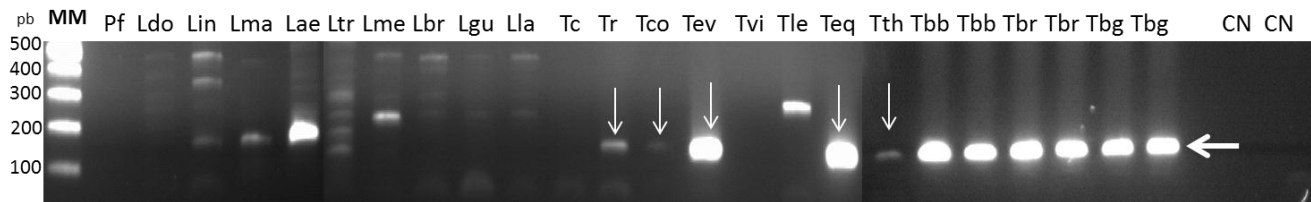


Figura 8. Resultado de la especificidad analítica de la RCP-ARNr 18S (A) y RCP-*hsp70*Tb (B). Electroforesis en gel de agarosa 2% que muestra los resultados de la amplificación del ADN mediante la RCP utilizado diferentes especies de parásitos. En cada carril se presentan las especies y subespecies de parásitos estudiados. Pfa: *Plasmodium falciparum*, Ldo: *L. donovani* (MHOM/SD/--/1-S), Lin: *L. infantum* (MHOM/FR/78/LEM75), Lma: *L. major* (MHOM/IL/67/LRC-L137), Lae: *L. aethiopica* (--/KE/--/161B), Ltr: *L. tropica* (MHOM/PS/01/ISL590), Lme: *L. mexicana* (MHOM/PE/02/LH2312), Lbra: *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/06/ICA), Lgu: *L. guyanensis* (MHOM/PE/02/LH2372), Lla: *L. lainsoni* (MHOM/BO/95/CUM71), Tcr: *T. cruzi* MHOM/VE/77/OPS21, Tr: *T. rangeli* RPLA4, Tco: *T. congolense* SER/71/STIB212, Tev: *T. evansi*, Rotat 1.2, Tvi: *T. vivax* Y486, Tle: *T. lewisi* ULBPU-Tlewis-1, Teq: *T. equiperdum* 940M, Tth: *T. theileri* T. thei; Tbb: *T. brucei brucei* AnTat17.1 y 927/4 GUTat10.1, Tbg: *T. b.gambiense* AnTat9.1 y ABBAa, Tbr: *T. b. rhodesiense* AnTat 25.1 y EATRO 3. En todos los casos se presenta la amplificación con 10ng de ADN. MM: Marcador de Peso Molecular, Molecular Gene™ Ruler 100bp ADN ladder plus (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania).

La repetibilidad se confirmó realizando la RCP-ARNr18S y RCP-*hsp70*Tb según las condiciones normalizadas, en tres días diferentes, utilizando los mismos reactivos, equipos, procedimientos y ADN de las tres subespecies de *T. brucei*. No se encontraron diferencias entre los patrones de amplificación (Figura 9 A y B).

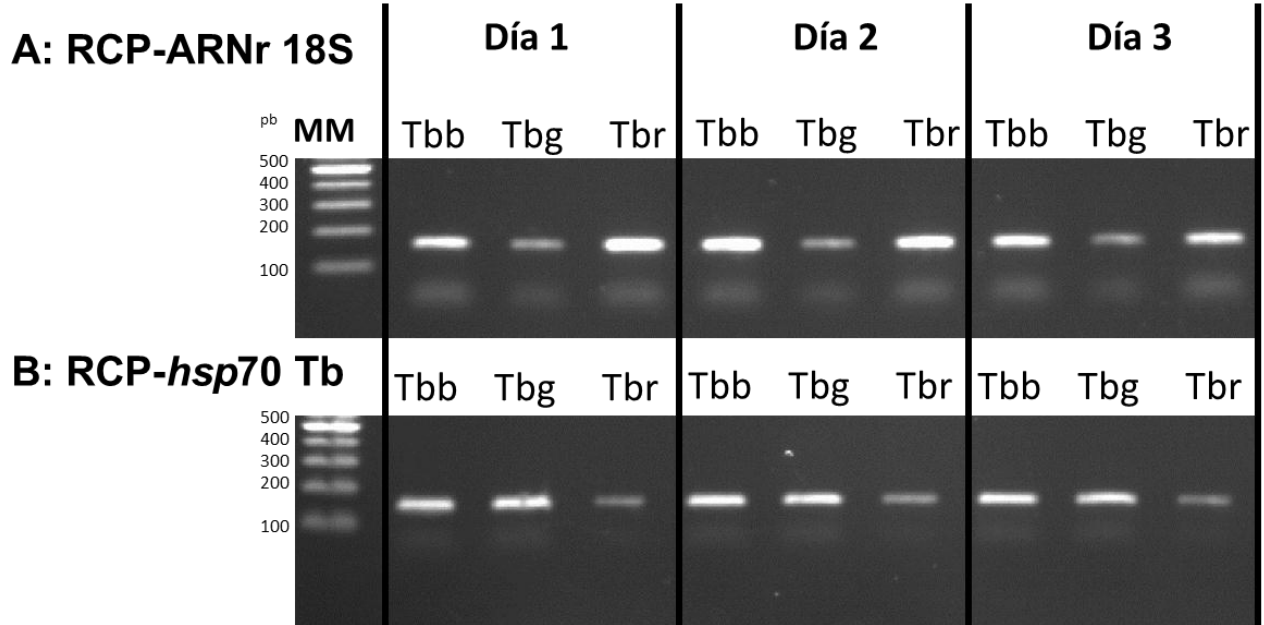
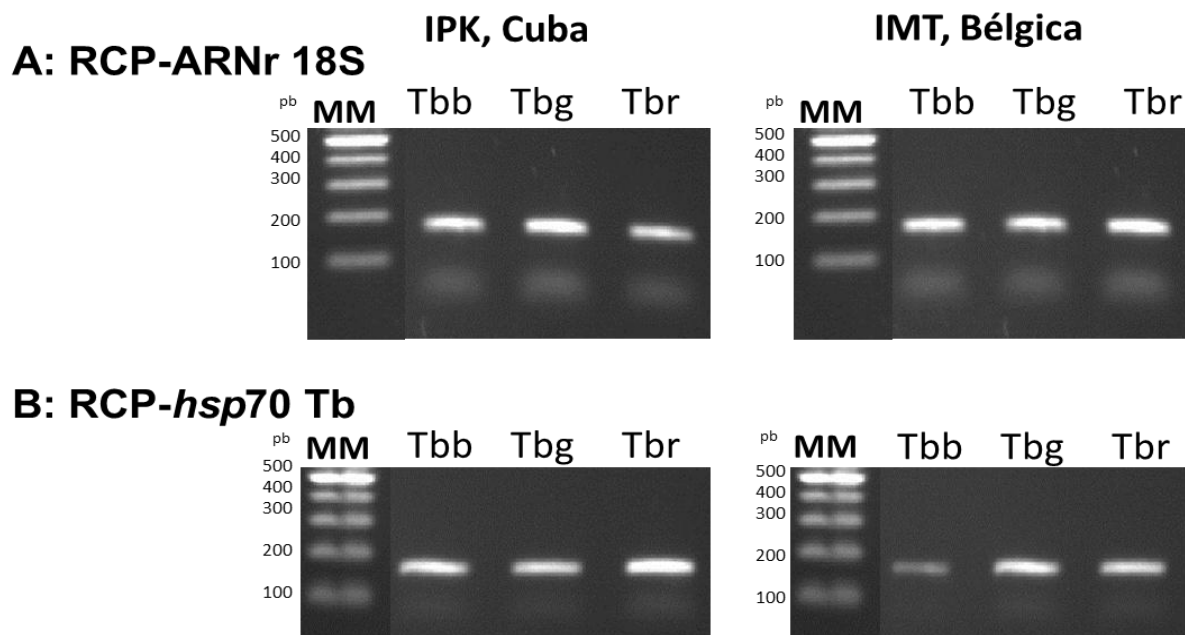


Figura 9. Resultados de la repetibilidad de la RCP-ARNr 18S (A) y RCP-hsp70Tb (B). Electroforesis en gel de agarosa 2 % que muestra los resultados de la amplificación del ADN utilizando cepas de las tres subespecies de *T. brucei*. Tbb: *T. brucei brucei* AnTat17.1, Tbg: *T. b.gambiense* AnTat9.1, Tbr: *T. b. rhodesiense* AnTat 25.1. MM: Marcador de Peso Molecular, Molecular GeneTM Ruler 100bp ADN ladder plus (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania).

Con relación a la reproducibilidad se prepararon mezclas de reacción con las cantidades previamente normalizadas, utilizando como molde ADN genómico de cepas correspondientes a las tres subespecies de *T. brucei*, para la amplificación en distintas condiciones, tanto en el IPK, Cuba; como en el laboratorio de Parasitología Molecular del IMT Amberes, Bélgica. Las mezclas se amplificaron en los correspondientes termocicladores de cada laboratorio. No se obtuvieron diferencias en los patrones de amplificación obtenidos entre ambos laboratorios para ninguna de las RCPs evaluadas como se presenta en la Figura 10.



5.4. Evaluación de la validez diagnóstica de las RCP-ARNr 18S y la RCP-*hsp70* para la detección de *T. brucei* en muestras clínicas

Para evaluar la utilidad de la RCP-ARNr 18S y la RCP-*hsp70* Tb se utilizaron 46 muestras, el grupo 1 corresponde a 20 pacientes de la República Democrática del Congo con diagnóstico confirmado de TAH mediante detección parasitológica directa (microscopía), cinco fueron muestra de LCR y 15 de sangre, el grupo 2 corresponde a 26 muestras de sangre de pacientes con confirmación de enfermedades parasitarias (Toxoplasmosis y Enfermedad de Chagas). Teniendo en cuenta como "regla de oro" la detección del parásito por microscopía en sangre y LCR se determinó la validez de la RCP-ARNr 18S y RCP-*hsp70* Tb a partir del cálculo de la sensibilidad y especificidad diagnóstica.

En la Figura 11 se muestra los resultados del análisis del panel de muestras utilizando la RCP-ARNr 18S. La sensibilidad diagnóstica de la RCP-ARNr 18S resultó ser de 95,00% (IC 95% 82,95-100) y la especificidad de 100% (IC 95% 98,08 -100) (Tabla 7).

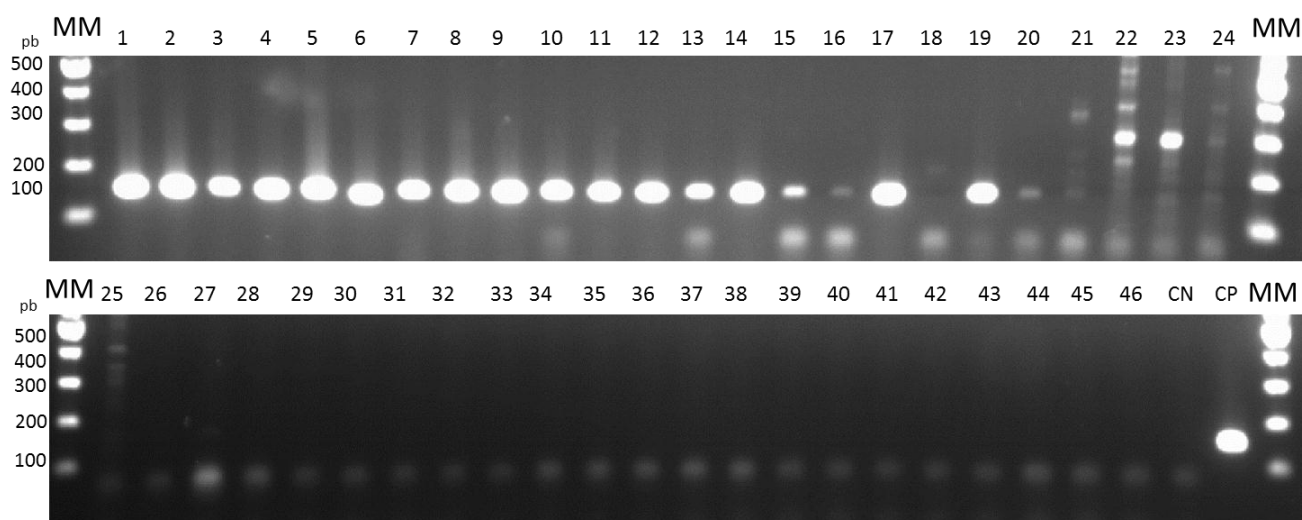


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa 2 % del producto de la RCP-ARNr 18S de las muestras clínicas evaluadas. CN: control negativo, CP: Control positivo ADN de la cepa de *T. brucei brucei* AnTat17.1. MM: Marcador de Peso Molecular, Molecular GeneTM Ruler 100bp ADN ladder plus (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania).

Tabla 7. Relación entre los resultados de la RCP-ARNr 18S normalizada y la presencia o ausencia de TAH, considerando como regla de oro el examen microscópico.

RCP- ARNr18S	Pacientes		Total de Pacientes
	Con TAH	Sin TAH	
Positivo	19 (95,0% ^a)	0	19
Negativo	1	26 (100% ^b)	27
Total de pacientes	20	26	46

^a Sensibilidad diagnóstica de la RCP-ARNr 18S

^b Especificidad diagnóstica de la RCP-ARNr 18S

En la Figura 12 se muestra los resultados del análisis del panel de muestras utilizando la RCP-*hsp70* Tb.

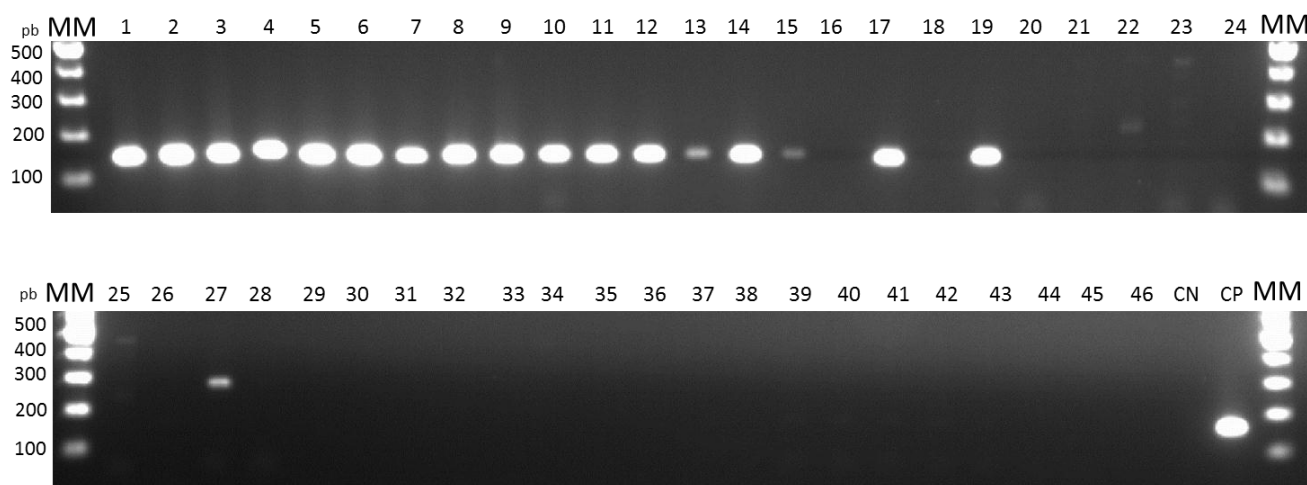


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa 2 % del producto de la RCP-*hsp70* Tb de las muestras clínicas evaluadas. CN: control negativo, CP: Control positivo ADN de la cepa de *T. brucei brucei* AnTat17.1. MM: Marcador de Peso Molecular, Molecular Gene™ Ruler 100bp ADN ladder plus (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania).

La sensibilidad diagnóstica de la RCP-*hsp70* Tb resultó ser de 85,00% (IC 95% 66,85-100) y la especificidad de 100% (IC 95% 98,08 -100) (Tabla 8).

Tabla 8. Relación entre los resultados de la RCP-*hsp70* Tb diseñada y normalizada y la presencia o ausencia de TAH, considerando como regla de oro el examen microscópico.

RCP- hsp70Tb	Pacientes		Total de Pacientes
	Con TAH	Sin TAH	
Positivo	17 (85,0% ^a)	0	17
Negativo	3	26 (100% ^b)	29
Total de pacientes	20	26	46

^a Sensibilidad diagnóstica de la RCP-*hsp70*Tb

^b Especificidad diagnóstica de la RCP-*hsp70*Tb

5.5. Concordancia de los métodos de las RCPs (RCP-ARNr 18S y RCP-hsp70Tb)

La concordancia entre los ensayos moleculares (RCP-ARNr 18S y RCP-hsp70Tb) fue excelente, cuando se analizó el conjunto de resultados obtenidos con el panel de muestras evaluado correspondiente a pacientes con TAH y sin TAH. El índice kappa resultó ser 0,9089 (IC

95 % 0,785-1.00).

6. DISCUSIÓN

Aunque hay relativamente pocos casos de TAH no endémica, en las últimas décadas, la incidencia de pacientes con la enfermedad en países no endémicos se ha incrementado en turistas que adquirieron la enfermedad mientras visitaban parques de caza en el este y el sudeste de África. TAH causada por *T. brucei rhodesiense* es relativamente poco común entre los africanos, ahora representa la mayoría de los casos reportados entre pacientes en países no endémicos (Neuberguer *et al.*, 2014). Los viajeros febriles que regresan sin un diagnóstico alternativo deben ser evaluados para TAH. Por todo esto es esencial que el conocimiento, la experiencia del diagnóstico y el tratamiento, estén disponibles en regiones no endémicas para cuando se presenten los casos, puedan ser diagnosticados y tratados de manera rápida y efectiva. A menudo no se sospecha de TAH en primera instancia por lo que se debería incluir en el uso de algoritmos de diagnósticos. De ahí que se recomienda su uso en centros de referencias, hospitales o institutos de países no endémicos, donde la experiencia en diagnóstico, las pruebas y el acceso a los tratamientos estén disponibles (Migchelsen *et al.*, 2011).

Una variedad de pruebas de diagnóstico molecular para la TAH se han desarrollado para la investigación, diagnóstico de la enfermedad en países endémicos o confirmación diagnóstica en medicina del viajero, siguiendo generalmente protocolos no estandarizados. Otras son juegos comerciales de diagnóstico que existen para el diagnóstico y la investigación de la TAH. La OMS tiene como objetivo eliminar la TAH como problema de salud para el año 2020 y alcanzar la transmisión cero para el año 2030. Para este empeño el diagnóstico molecular puede jugar un papel importante en este proceso (Deborggrave y Büsher, 2015).

La detección precisa de *Tripanosoma* tanto en la sangre del hospedero como en los vectores depende en gran medida de métodos moleculares y en específico de la RCP, técnica altamente sensible y específica. Los cebadores específicos de la especie que amplifican *Tripanosoma* patógenos se han diseñado y utilizado para detectar, caracterizar *Tripanosomas* y ser aplicados en estudios epidemiológicos (Gonzales *et al.*, 2003). Además, para el seguimiento postratamiento, las técnicas de biología molecular para muchos autores parece ser de utilidad. La especificidad y la sensibilidad de la RCP de diagnóstico dependen principalmente de la secuencia de ADN. Por lo tanto, es importante continuar investigando y diseñando nuevos cebadores para optimizar la amplificación (Deborggraeve y Büscher, 2010). La RCP no es del todo óptima en el campo y aún es discutible dentro de la comunidad científica (Bonnet *et al.*, 2015). De forma general las pruebas moleculares se han propuesto como herramientas de diagnóstico sensibles para la TAH; sin embargo, la exactitud de estas pruebas para el diagnóstico no ha sido completamente verificada (Mugase *et al.*, 2012).

Las secuencias diana mejor validadas para la técnica de la RCP son las regiones del ADN satélital específicas para *Trypanozoon* (Moser *et al.*, 1989) y el gen del ARN ribosomal 18S (Deborggrave *et al.*, 2011). Además, se han utilizado el gen asociado a los sitios de expresión 6 y 7 (ESAG6-7) (Kabiri *et al.*, 1999), la glicoproteína específica para *T. brucei gambiense* (Radwanska *et al.*, 2002) y los genes asociados a la resistencia al suero (Picozzi *et al.*, 2005).

El LNRP-IPK necesita contar con herramientas moleculares que permitan, junto con las herramientas microscópicas, poder garantizar el diagnóstico de la TAH. A tales efectos ha tenido como objetivo introducir un método molecular basado en la RCP con buenos resultados de validez y seguridad diagnóstica. Por otro parte, a su vez diseñar un método de RCP basado en la secuencia del gen *hsp70* utilizado por el grupo de trabajo del LNRP-IPK en el diagnóstico de otros *Trypanosomatideos* con excelentes resultados. Además, tendría la finalidad de evaluarse y comparar distintos métodos diagnósticos en el futuro para contribuir a los escasos estudios de evaluación de métodos moleculares diagnóstico de la TAH con la finalidad de determinar el método molecular con el que se obtienen los mejores valores de validez y seguridad diagnóstica.

La RCP-ARNr 18S fue el método de RCP escogido para ser introducido en el LNR-IPK. Esta diana genética es un gen multicopia (> 1 0000 copias) (van der Meide *et al.*, 2005) y es comúnmente utilizado para el diagnóstico molecular basado en la RCP de infecciones por *Trypanosomas* a nivel de subgénero y especie (Desquesnes y Dávila, 2002; Lukes *et al.*, 1997; Thumbi *et al.*, 2008; Deborggrave *et al.*, 2011). El juego de cebadores utilizado permite la amplificación de las tres subespecies de *T. brucei* y se ha demostrado su validez y seguridad diagnóstica en el diagnóstico de la TAH a partir de muestras de sangre y LCR, así como determinar el estado de la enfermedad (Deborggrave *et al.*, 2011).

El gen que codifica la HSP70 citoplasmática de *T. brucei* fue el escogido para diseñar un método de RCP para su detección, al considerarlo un marcador promisorio con el que se han obtenido buenos resultados de validez y seguridad diagnóstica en la detección y diferenciación de especies de *Leishmania*, la detección y diferenciación de *T. cruzi* y *T. rangeli* y la diferenciación de los linajes de *T. cruzi* (García *et al.*, 2004; Montalvo *et al.*, 2010a; Graça *et al.*, 2012; Fraga *et al.*, 2012; 2013; 2014; Montalvo *et al.*, 2014; Veland *et al.*, 2012; Montalvo *et al.*, 2014; 2015; 2017b).

La RCP permite la amplificación exponencial de secuencias específicas de ADN que pueden encontrarse en la muestra en mínimas cantidades, demostrando que es una herramienta útil para el diagnóstico, siempre y cuando se logre la normalización de los componentes de la reacción. Dicha normalización, constituye un elemento indispensable cuando esta técnica se introduce por primera vez en un laboratorio con fines diagnósticos. Se normalizaron los parámetros de la reacción con ADN purificado, seleccionándose la concentración óptima de los principales componentes de la reacción: cebadores, cloruro de magnesio y Taq ADN polimerasa, elementos que influyen en la sensibilidad y especificidad de la prueba (Weiss *et al.*, 1995).

La elección de los cebadores debe realizarse de forma cuidadosa y habitualmente, es el factor más crítico durante la amplificación. En este trabajo, los cebadores utilizados en cada uno de los métodos presentan las características generales necesarias, como son: longitud

(18 – 25 nucleótidos), el contenido de Guanina y Citosina entre 40 al 60 % y su distribución de forma regular a lo largo de la secuencia. Su concentración es otro aspecto importante en la mezcla de reacción, pues bajas concentraciones disminuyen el rendimiento mientras aumentan la especificidad; así como concentraciones elevadas provocan lo contrario (Steffen *et al.*, 1999, Lorenz, 2012). En nuestro caso, se determinó como condición óptima 1,6 μM para los dos métodos de RCP introducido y diseñado.

La concentración de MgCl_2 es un aspecto importante en la mezcla de reacción y debe ser optimizado cuidadosamente pues diferentes concentraciones pueden conllevar a diferencias significativas en la eficiencia de las reacciones y el rendimiento de los productos de la RCP. Las ADN polimerasas termoestables requieren la presencia de magnesio para actuar como un cofactor durante el proceso de reacción. En ausencia de una adecuada cantidad de Mg^{2+} la enzima se inactiva y no hay amplificación o hay un bajo rendimiento. Por otra parte, el exceso del mismo reduce la fidelidad de la enzima e incrementa el número de amplificaciones inespecíficas, lo cual disminuye la fidelidad de la reacción (Williams *et al.*, 1989; Eckert y Kundell, 1990; Ellsword *et al.*, 1993; Lorenz, 2012). La concentración de magnesio es muy fácil de manipular con el mayor impacto en la rigurosidad de la RCP. El rango de concentración recomendado debe estar entre 1- 4 mM, bajo las condiciones normales de reacción y la concentración habitual, para 200 μM de dNTPs, en un rango de $2 \pm 0,5$ mM (Steffen, 1999, Lorenz, 2012). En este trabajo, la concentración óptima fue de 2,0 mM de MgCl_2 para ambas reacciones normalizadas.

La concentración de enzima (Taq ADN Polimerasa) es un factor importante a tener en cuenta en la RCP, debido a que concentraciones tanto altas como bajas respecto a la óptima, afectan la eficiencia de la reacción (Steffen *et al.*, 1999; Lorez, 2012). Para muchos ensayos la cantidad óptima se encuentra entre 0,5 y 2,5 U en 25 μL de volumen final de reacción. Concentraciones superiores disminuyen la especificidad y se pueden generar artefactos relacionados con la actividad exonucleasa 5'- 3' (Longley *et al.*, 1990; Bell y De Marini, 1991). En nuestro caso, la concentración de 1,5 U para 25 μL de reacción fue suficiente.

El resto de los componentes de la reacción, dNTPs y tampón de amplificación, se utilizaron a las concentraciones recomendadas. La concentración habitual para los dNTPs es 200 μ M y es fundamental tener una concentración equimolar de los cuatro dNTPs, ya que el desequilibrio, disminuye el rendimiento y favorece la tasa de error de copia. La concentración del tampón de amplificación que se utilizó, fue la que recomiendan los fabricantes (Steffen, 1999; Lorez, 2012).

La eficacia de la unión de los cebadores es un factor muy importante para el éxito y la rigurosidad de la RCP y puede modificarse mediante factores como la constitución química del tampón (potenciadores de la RCP, codisolventes), concentración de cebadores, concentración de $MgCl_2$ y temperatura de hibridación (Markoulatos *et al.*, 2002). La amplificación por la RCP debe normalizarse para alcanzar la temperatura hibridación más baja, donde la reacción sigue siendo específica y no se observan productos inespecíficos. Si la temperatura de hibridación es muy baja se amplifican fragmentos no específicos, si la temperatura de hibridación es muy alta, el rendimiento del producto deseado y, a veces, la pureza se reduce debido a la deficiencia de la unión de los cebadores (Lorenz, 2012). Como resultado del gradiente de temperaturas realizado en este estudio se definió 60°C como la temperatura óptima en cada uno de los ensayos normalizados.

Luego de la selección de secuencia diana y cebadores a evaluar, fue imprescindible detectar la menor cantidad posible de parásitos que pudieran encontrarse en las muestras clínicas a ser analizadas. Una vez normalizados los parámetros de la RCP, se determinó la sensibilidad y especificidad analítica para cada una de las RCP. Se ha reportado en la literatura que la RCP-ARNr 18S permite amplificar y detectar 1 ng de ADN de *T. brucei gambiense* y *T. brucei rhodesiense*, así como 1 parásito de *T. brucei gambiense* en 180 μ L de sangre humana (Deborggraeve *et al.*, 2011). Al evaluar la sensibilidad analítica de la RCP-ARNr 18S utilizando ADN puro de las tres subespecies de *T. brucei* se obtuvo que la misma puede detectar hasta 0,01 pg de ADN (10 fg) independiente de la subespecie, es equivalente a 1/20 del ADN contenido en un solo parásito (1 parásito es equivalente a 0,1pg de ADN genómico) (Deborggraeve *et al.*, 1996; Deborggraeve y Büsher, 2010). De esta manera se demuestra que los cebadores para la RCP ARNr 18S pueden amplificar igualmente todas las

subespecies de *T. brucei* con muy alta sensibilidad analítica, aunque observamos como resultado amplicones de diferentes intensidades. Probablemente, este constituye el primer estudio que evalúa la sensibilidad analítica a partir de diluciones de ADN de cepas de referencia de este juego de cebadores utilizando ADN procedente de cepas de las tres subespecies del parásito. Estudios anteriores se habían realizado con *T. brucei gambiense* (Deborggraeve *et al.*, 2011) obteniéndose los valores de sensibilidad analítica reportados. El ARNr 18S ha sido utilizado como secuencia diana en otros métodos moleculares como la RCP-oligocromatografía, amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), oligocromatografía-NASBA y la hibridización-in situ fluorescente (PNA-FISH) con sensibilidades analíticas entre 0,005 y 1 parásito (Deborggraeve *et al.*, 2006; Radwanska *et al.*, 2002; Mugasa *et al.*, 2009).

Con relación a la RCP-*hsp70* Tb diseñada en este trabajo, Pudiera ser la primera vez que se utiliza esta secuencia diana en el diagnóstico de la TAH. Con ella se pudo detectar hasta 0,01 pg de ADN (10 fg) de las subespecies *T. brucei gambiense* y *T. brucei rhodesiense* y hasta 0,1 pg (100 fg) de *T. brucei brucei*. Se encontró que de forma general, tiene una excelente sensibilidad analítica al ser capaz de detectar entre 0,1 y 1 parásito para las tres subespecies de *T. brucei*.

De forma simultánea, la evaluación de la especificidad analítica de cada una de las RCP mostró el reconocimiento y amplificación de la banda esperada para el ADN de las especies correspondientes al subgénero *Trypanozoon* (*T. brucei*, *T. equiperdium* y *T. evansi*) no así para *P. falciparum* ni para las especies de *Leishmania* evaluadas. Sin embargo, al estudiar otras especies de *Trypanosoma* la RCP-ARNr 18S obtuvo la banda de amplificación de alrededor de 150 pb en *T. cruzi* y para el caso de la RCP-*hsp70*Tb se obtuvo la banda de 141 pb en *T. rangeli*, *T. congolense* y *T. theileri*. En todos los casos corresponden a bandas de amplificación muy tenues a una concentración de 10 ng que equivale a 10^5 parásitos. La especificidad analítica de la RCP-ARNr 18S había sido estudiada previamente por (Deborggraeve *et al.*, 2011) quienes solo encontraron la amplificación en *T. brucei gambiense* y *T. brucei rhodesiense* al estudiar además de estos parásitos *P. falciparum*,

L. donovani, *Mycobacterium tuberculosis* y *Schistosoma mansoni*. No se reportó amplificación con 50 ng de cada una de las especies estudiadas. Es válido mencionar que no existen reportes anteriores de la evaluación analítica de esta RCP hasta el descrito en este trabajo. Estudios futuros podrían conducir a demostrar la capacidad de detección de otras especies de *Trypanosoma*, que en el presente trabajo amplificaron a una concentración de 10 ng con el fin de verificar su posible uso en el diagnóstico de estos parásitos y evaluar la utilidad de la técnica en el diagnóstico de los mismos.

Una vez normalizada las técnicas y demostrado además su repetibilidad y reproducibilidad se pasó a evaluar la validez diagnóstica de cada una de los métodos de RCP introducidos y diseñados utilizando un panel de muestras bien caracterizado. Es de destacar que el análisis del panel de muestras se desarrolló a ciegas. Después de tener los resultados se compararon con los obtenidos por el IMT, Bélgica en cuanto a los casos confirmados con la TAH. Es así como la RCP-ARNr 18S en nuestro estudio fue capaz de detectar 95,0 % de los pacientes confirmados por la TAH, porcentaje similar (88,4%) al descrito por (Deborggraeve *et al.*, 2011) en un estudio llevado a cabo en 358 casos de la República del Congo utilizando el mismo juego de cebadores. Se resalta en el actual estudio que se utilizó solo un panel de muestras que correspondía a 20 pacientes con la TAH confirmada. Con relación a la RCP-*hsp70Tb* fue capaz de detectar el 85,0 % de los pacientes confirmados con TAH. No existen antecedentes de la utilización de esta diana genética para este propósito, sin embargo podemos decir que de los 11 estudios de RCP que utilizan diferentes dianas moleculares y están reportados en la literatura, la sensibilidad diagnóstica media es de 99 % (88,0 – 100 %) (Mugasa *et al.*, 2012).

La muestra de sangre del paciente confirmado con la TAH que fue negativa con los ensayos desarrollados en el presente trabajo y que había sido negativa por la RCP desarrollada en el IMT, Bélgica puede explicarse por la parasitemia fluctuante que pueden sufrir los pacientes. En otras palabras, el número de parásitos en la circulación aumenta dramáticamente y puede caer formando picos de parasitemia (Ross y Thomas 1910). Debido a que estos picos se han asociado generalmente con fiebre y otras manifestaciones clínicas, el muestreo de sangre repetido en estos momentos de picos puede aumentar la posibilidad de encontrar parásitos

en sangre (Chappuis *et al.*, 2005) aumentando así la sensibilidad de la prueba de diagnóstico. Largos períodos de parasitemia han sido reportados en Costa de Marfil (endémica para TAH gambiense) por Jamonneau y colaboradores (2000). Esto fue después del seguimiento serológico de 6 personas sospechosas que fueron al principio parasitológicamente positivas, pero se mantuvieron negativas después de varios años sin recibir tratamiento. Esto puede explicar la parasitemia no detectada en el caso que se menciona. Las dos muestras negativas adicionales resultado de la evaluación de la RCP-*hsp70* Tb sí son resultado de la sensibilidad de la técnica.

Con relación a la especificidad diagnóstica ambos ensayos mostraron un 100 %. De forma concreta la RCP-ARNr 18S mostró una especificidad diagnóstica de 99,2 % en el estudio realizado por (Deborggraeve *et al.*, 2011) al analizar 129 individuos procedentes de áreas endémicas sin la TAH. Estos resultados están en concordancia con la especificidad diagnóstica media de 97,7% de los métodos de RCP reportada por (Mugasa *et al.*, 2012) en la revisión sistemática realizada sobre la validez de la técnica de RCP para el diagnóstico de la TAH.

Al evaluar la concordancia entre los métodos moleculares RCP-ARNr 18S y RCP-*hsp70* Tb se encontró una excelente concordancia, lo que avala la utilización de los mismos dentro de las pruebas diagnósticas con la que contaremos en el LNRP-IPK para afrontar el diagnóstico molecular de la TAH.

Finalmente, el diagnóstico molecular en la TAH ha tenido éxito con técnicas moleculares sensibles que permiten la detección y diferenciación de los parásitos. Sin embargo, hay muchas limitaciones, incluidos los hechos que estas pruebas están restringidas a laboratorios de referencia y no se encuentran disponibles para su uso en el campo. Por lo tanto, se hace necesario diseñar pruebas de detección rápidas, simples, económicas, y confiables.

6. CONCLUSIONES

1. Se logró validar la técnica de la RCP-ARNr 18S para el diagnóstico de *T. brucei* con una alta sensibilidad analítica para las tres subespecies de *T. brucei*, así como una buena especificidad , con resultados satisfactorios de repetibilidad y reproducibilidad, corroborándose su validez diagnóstica para la TAH.
2. Se diseñó y validó la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa hsp70Tb la cual mostró alta sensibilidad analítica para las tres subespecies de *T. brucei*, así como una buena especificidad con resultados satisfactorios de repetibilidad, reproducibilidad y validez diagnóstica.
3. Las técnicas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa ARNr 18S y hsp70 Tb, mostraron concordancia excelente, pudiendo ser utilizadas para la detección de *T. brucei* en el Laboratorio Nacional de Referencia de Parasitología del IPK a partir de muestras clínicas (sangre y LCR) de pacientes con TAH.

8- RECOMENDACIONES

1. Evaluar la técnica de la RCP-hsp70 Tb en un mayor número de muestras clínicas de sangre y LCR de pacientes confirmados y sospechosos de TAH y personas sanas procedentes de áreas endémicas de la enfermedad.
2. Introducir la técnica de la RCP en tiempo real para el diagnóstico de la TAH.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abd-Elsalam KA. Bioinformatic tools and guideline for RCP primer design. *African J. Biotech* 2003; 2: 91-95.
- Altman DG, Bland JM. Statistics Notes: Diagnostic tests 1: sensitivity and specificity. *BMJ* 1994; 308: 1552.
- Auty H, Anderson NE, Picozzi K, Lembo T, Mubanga J, Hoare R, *et al.* Trypanosome diversity in wildlife species from the serengeti and Luangwa Valley ecosystems. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6:e1828.
- Balasegaram M, Harris S, Checchi F, Hamel C, Karunakara U. Treatment outcomes and risk factors for relapse in patients with early-stage human African trypanosomiasis (TAH) in the Republic of the Congo. *Bull World Health Organ* 2006; 84: 777–82.
- Barnabé C, Brisse S, Tibayrenc M. Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach. *Parasitology* 2000; 120:513-26.
- Barrett MP, Burchmore RJ, Stich A, Lazzari JO, Frasch AC, Cazzulo JJ, Krishna S. The trypanosomiasis. *Lancet* 2003; 362:1469-80.
- Barrett MP1, Burchmore RJ, Stich A, Lazzari JO, Frasch AC, Cazzulo JJ, Krishna S. The trypanosomiasis. Lancet. 2003 Nov 1;362(9394):1469-80.*
- Bell DA, De Marini DM. Excessive cycling converts RCP products to random length higher molecular fragments. *Nucleic Acid Res* 1991; 19:5079.
- Bilonda Mpiana A, Kabengele Mpinga E, Bukasa Tshilondan JC. Risk factors of human African trypanosomiasis in Mbuji Mayi, Eastern Kasai Province, Democratic Republic of the Congo. *Int J Trop Dis Health* 2015; 5: 190–208.
- Bisser S, Lumbala C, Nguertoum E. Sensitivity and specificity of a prototype rapid diagnostic test for the detection of *Trypanosoma brucei gambiense* infection: a multi-centric prospective study. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10: e0004608
- Bitonti AJ, Bacchi CJ, McCann PP, Sjoerdsma A. Uptake of alpha-difluoromethylornithine by *Trypanosoma brucei brucei*. *Biochem Pharmacol* 1986; 35: 351–4.
- Blum J, Schmid C, Burri C. Clinical aspects of 2541 patients with second stage human African trypanosomiasis. *Acta Trop* 2006; **97**: 55–64.
- Blum JA, TAHz CF. Treatment of cutaneous leishmaniasis in travelers. *J Travel Med* 2009; 16:123–131

- Blum JA, Neumayr AL, TAHz CF. Human African trypanosomiasis in endemic populations and travellers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31: 905–13.
- Blum JA, Neumayr AL, TAHz CF. Human African trypanosomiasis in endemic populations and travellers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31:905-13.
- Blum JA, Schmid C, Burri C. Cardiac alterations in human African trypanosomiasis (*T. b. gambiense*) with respect to the disease stage and antiparasitic treatment. *PLoS Negl Trop Dis* 2009; 3: e383.
- Bonnet J, Boudot C, Courtioux B. Overview of the Diagnostic Methods Used in the Field for Human African Trypanosomiasis: WTAH Could Change in the Next Years? *Biomed Res Int* 2015; 583262.
- Bonnet J, Boudot C, Courtioux B. Overview of the Diagnostic Methods Used in the Field for Human African Trypanosomiasis: WTAH Could Change in the Next Years? *Biomed Res Int* 2015; 583262.
- Bosseno MF, Telleria J, Vargas F, Yaksic N, Noireau F, Morin A, *et al.* *Trypanosoma cruzi*: study of the distribution of two widespread clonal genotypes in Bolivian *Triatoma infestans* vectors shows a high frequency of mixed infections. *Exp Parasitol* 1996; 83: 275-82.
- Breniere SF, Lopez J, Vargas F, Barnabe C. Genetic variability and microdistribution of *Triatoma infestans* genotypes and *Trypanosoma cruzi* clones in Arequipa region (Peru). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997; 92: 401-8.
- Breniere SF, Morochi W, Bosseno MF, Ordonez J, Gutierrez T, Vargas F, *et al.* *Trypanosoma cruzi* genotypes associated with domestic *Triatoma sordida* in Bolivia. *Acta Trop* 1998; 71: 269-83.
- Brun R, Blum J, Chappuis F, Burri C. Human African trypanosomiasis. *Lancet* 2010; 375: 148–59.
- Buguet A, Bourdon L, Bouteille B. The duality of sleeping sickness: focusing on sleep. *Sleep Med Rev* 2001; 5: 139–53.
- Büscher P, Cecchi G, Jamonneau V, Priotto G. Human African trypanosomiasis. *Lancet* 2017; 390: 2397-2409.
- Büscher P, Deborggraeve S. How can molecular diagnostics contribute to the elimination of human African trypanosomiasis? *Expert Rev Mol Diagn* 2015; 15:607-15.

- Camara O, Camara M, Lejon V. Immune trypanolysis test with blood spotted on filter paper for epidemiological surveillance of sleeping sickness. *Trop Med Int Health* 2014; 19: 828–31.
- Carmelo E, Zurita AI, Martinez E, Valladares B. The sera from individuals suffering from cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* present antibodies against parasitic conserved proteins, but not their human counterparts. *Parasite* 2006;13:231-6.
- Carod-Artal FJ. Trypanosomiasis. En: Lisak R, Truong D, Carroll W, Bhidayasiri R, eds. *International Neurology : a clinical approach*. Oxford. 2009; pp. 290-292.
- Cavazzana Jr M, Marcili A, Lima L, da Silva FM, Junqueira AC, Veludo HH, *et al.* Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (ssrRNA and gGAPDH) and mitochondrial (Cyt b) genes of trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* parasitic in Brazilian bats. *Int. J. Parasitol* 2010; 40, 345–355.
- Cecchi G, Mattioli RC, Slingenbergh J, de la Rocque S. Land cover and tsetse fly distributions in sub-Saharan Africa. *Med Vet Entomol* 2008; 22:364-73.
- Centers for Disease Control & Prevention National Center for Infectious Diseases Division of Parasitic Diseases 1ra. Edicion-Castellano-2006
- Chappuis F, Loutan L, Simarro P, Lejon V, Büscher P. Options for field diagnosis of human african trypanosomiasis. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18:133-46.
- Chappuis F, Udayraj N, Stietenroth K, Meussen A, Bovier PA. Eflornithine is safer than melarsoprol for the treatment of second-stage *Trypanosoma brucei gambiense* human African trypanosomiasis. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 748–51.
- Chappuis F, Udayraj N, Stietenroth K, Meussen A, Bovier PA. Eflornithine is safer than melarsoprol for the treatment of second-stage *Trypanosoma brucei gambiense* human African trypanosomiasis. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 748–51.
- Checchi F, Barrett MP. African sleeping sickness. *BMJ* 2008; 336(7646):679-80.
- Checchi F, Chappuis F, Karunakara U, Priotto G, Chandramohan D. Accuracy of five algorithms to diagnose gambiense human African trypanosomiasis. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5: e1233.

- Checchi F, Chappuis F, Karunakara U, Priotto G, Chandramohan D. Accuracy of five algorithms to diagnose gambiense human African trypanosomiasis. PLoS Negl Trop Dis 2011;5:e1233.
- Checchi F, Filipe JAN, Barrett MP, Chandramohan D. The natural progression of *gambiense* sleeping sickness: wTAH is the evidence? PLoS Negl Trop Dis 2008; 2: e303.
- Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. Educ Psychol Meas 1960; 20:37-46.
- Deborggraeve S, Büscher P. Molecular diagnostics for sleeping sickness: wTAH is the benefit for the patient? Lancet Infect Dis 2010; 10:433-9.
- Deborggraeve S, Buscher P. Recent progress in molecular diagnosis of sleeping sickness. Expert Rev Mol Diagn 2012; 12: 719–30.
- Deborggraeve S, Claes F, Laurent T, Mertens P, Leclipteux T, Dujardin JC, et al. Molecular dipstick test for diagnosis of sleeping sickness. J Clin Microbiol 2006; 44:2884-9.
- Deborggraeve S, Lejon V, Ekangu RA, Mumba Ngoyi D, Pati Pyana P, et al. Diagnostic accuracy of RCP in gambiense sleeping sickness diagnosis, staging and post-treatment follow-up: a 2-year longitudinal study. PLoS Negl Trop Dis 2011; 5: e972.
- Desquesnes M, Dávila AM. Applications of RCP-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. Vet Parasitol; 2002; 109:213-31.
- Duggan AJ, Hutchinson MP. Sleeping sickness in Europeans: a review of 109 cases. J Trop Med Hyg 1966; 69:124–131
- Eckert K, Kundel T. High fidelith ADN synthesis by the thermus aquaticus ADN polimerase. Nucleic Acid Res 1990; 18:3739-44.
- Ellsworth D, Rittenhouse K, Honeycutt R. Artifactual variation in Randomly Amplified Polymorphic ADN banding patterns. Biotechniques 1993; 14:214-7.
- Fenn K, Matthews KR. The cell biology of *Trypanosoma brucei* differentiation. Current Opinion in Microbiology 2007;10:539–546.
- Folgueira C, Requena JM. A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. FEMS Microbiol Rev 2007;31:359-77.
- Fraga J, Fernández-Calienes A, Montalvo AM, Maes I, Deborggraeve S, Büscher P, Dujardin JC, Van der Auwera G. Phylogenetic analysis of the Trypanosoma genus based on the heat-shock protein 70 gene. Infect Genet Evol 2016; 43:165-72.

- Fraga J, Fernandez-Calienes A, Montalvo AM, Maes I, Dujardin JC, Van der Auwera G. Differentiation between *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* using heat-shock protein 70 polymorphisms. *Trop Med Int Health* 2014;19:195-206.
- Fraga J, Montalvo AM, Maes I, Dujardin JC, Van der Auwera G. HindII and SduI digests of heat-shock protein 70 RCP for *Leishmania* typing. *Diagn Microbiol Inf Dis* 2013; 77:245-7.
- Fraga J, Veland N, Montalvo AM, Praet N, Boggild A, Valencia B, Arévalo J, Llanos-Cuentas A, Dujardin JC, Van der Auwera G. Accurate and rapid species typing from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis lesions of the New World. *Diagn Microbiol Inf Dis* 2012; 74: 142-150.
- Franco JR, Cecchi G, Priotto G, Paone M, Diarra A, Grout L, Mattioli RC, Argaw D. Monitoring the elimination of human African trypanosomiasis: Update to 2014. *PLoS Negl Trop Dis* 2017;11:e0005585.
- Franco JR, Simarro PP, Dia A, Ruiz-Postigo JA, Samo M, Jannin JG. Monitoring the use of nifurtimox-eflornithine combination therapy (NECT) in the treatment of second stage *gambiense* human African trypanosomiasis. *Res Rep Trop Med* 2012; 3: 93–101.
- Garcia L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, *et al.* Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a RCP-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *J Clin Microbiol* 2004; 42:2294-7.
- González J, Cornejo A, Santos MR, Cordero EM, Gutiérrez B, Porcile P, *et al.* A novel protein phosphatase 2A (PP2A) is involved in the transformation of human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* 2003;374:647-56.
- González-Andrade P, Camara M, Ilboudo H, Bucheton B, Jamonneau V, Deborggraeve S. Diagnosis of trypanosomatid infections: targeting the spliced leader RNA. *J Mol Diagn* 2014;16: 400-4.
- Graça GC, Volpini AC, Romero GA, Oliveira Neto MP, Hueb M, Porrozzi R, *et al.* Development and validation of RCP-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012; 107:664-74.

- Grébaut P, Melachio T, Nyangmang S, Eyenga VE, Njitchouang GR, Ofon E, *et al.* Xenomonitoring of sleeping sickness transmission in Campo (Cameroon). *Parasit Vectors* 2016; 9:201.
- Hamilton, P.B., Stevens, J.R., Gaunt, M.W., Gidley, J., Gibson, W.C. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphTAHe dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. *Int. J. Parasitol* 2004; 34, 1393–1404.
- Hartl, F. U. y Hayer-Hartl, M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295, 1852-1858.
- Herwaldt BL. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 659–88.
- Hira PR, Husein SF. Some transfusion-induced parasitic infections in Zambia. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 1979; 23: 436–44.
- Hoare, C.A. The Trypanosomes of Mammals. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1972.
- Hughes AL, Piontkivska H. Molecular phylogenetics of Trypanosomatidae: contrasting results from 18S-rRNA and protein phylogenies. *Kinetoplastid Biol. Dis.* 2003; 2,15.
- Jamonneau V, Bucheton B. The challenge of serodiagnosis of sleeping sickness in the context of elimination. *Lancet Glob Health* 2014;2:e306-7.
- Jamonneau V, Camara O, Ilboudo H, Peylhard M, Koffi M, Sakande H, *et al.* Accuracy of individual rapid tests for serodiagnosis of gambiense sleeping sickness in West Africa. *PLoS Negl Trop Dis* 2015; 9:e0003480.
- Jamonneau V, Garcia A, Frezil JL, N'Guessan P, N'Dri L, Sanon R, Laveissière C, Truc P. Clinical and biological evolution of human trypanosomiasis in C te d'Ivoire. *Ann Trop Med Parasitol* 2000; 94:831-5.
- Jamonneau V, Ilboudo H, Kaboré J, Kaba D, Koffi M, Solano P, *et al.* Untreated human infections by *Trypanosoma brucei* gambiense are not 100% fatal. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6:e1691.
- Kabiri JM, Franco JR, Simarro PP, Ruiz JA, Sarsa M, *et al.* Detection of *Trypanosoma brucei* gambienses in sleeping sickness suspected by RCP amplification of expression-site-associated genes 6 and 7. *Trop Med Int Health* 1999; 4: 658-661.
- Kagbadouno MS, Camara M, Rouamba J. Epidemiology of sleeping sickness in Boffa (Guinea): where are the trypanosomes? *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6: e1949.

- Kato CD, Nanteza A, Mugasa C, Edyelu A, Matovu E, Alibu VP. Clinical profiles, disease outcome and co-morbidities among *T. b. rhodesiense* sleeping sickness patients in Uganda. PLoS One 2015; 10: e0118370.
- Kelly S, Ivens A, Manna PT, Gibson W, Field MC. A draft genome for the African crocodilian trypanosome *Trypanosoma grayi*. Sci Data 2014; 1: 140024.
- Kouchner G, Bouree P, LowenTAHL M. Hepatic involvement in *Trypanosoma rhodesiense* trypanosomiasis. Bull Soc Pathol Exot Filiales 1979; 72: 131–35 (in French).
- Kristensson K, Masocha W, Bentivoglio M. Mechanisms of CNS invasion and damage by parasites. Handb Clin Neurol 2013; 114:11-22.
- Kuepfer I, Schmid C, Allan M. Safety and efficacy of the 10-day melarsoprol schedule for the treatment of second stage *Rhodesiense* sleeping sickness. PLoS Negl Trop Dis 2012; 6: e1695.
- Kupfer I, Hhary EP, Allan M, Edielu A, Burri C, Blum JA. Clinical presentation of *T.b. rhodesiense* sleeping sickness in second stage patients from Tanzania and Uganda. PLoS Negl Trop Dis 2011; 5: e968.
- Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics. 1977. 33:159-174.
- Lejon V, Buscher P. Serological diagnosis. In: Cattand P, Louis FJ, Simarro PP, eds. Sleeping sickness lectures. Gemenos: Association contre la Trypanosomiase en Afrique, 2013: 199–214.
- Lejon V, Ngoyi DM, Boelaert M, Büscher P. A CATT negative result after treatment for human African trypanosomiasis is no indication for cure. PLoS Negl Trop Dis 2010; 4(1):e590.
- Lestrade-Carluer De Kyvon MA, Maakaroun-Vermesse Z, Lanotte P. Congenital trypanosomiasis in child born in France to African mother. Em Inf Dis 2016; 22: 935–7.
- Lima L, Espinosa-Alvarez O, Hamilton PB, Neves L, Takata CS, Campaner M, et al. *Trypanosoma livingstonei*: a new species from African bats supports the bat seeding hypothesis for the *Trypanosoma cruzi* clade. Parasit Vectors 2013; 6, 221.
- Lindner AK, Priotto G. The unknown risk of vertical transmission in sleeping sickness--a literature review. PLoS Negl Trop Dis 2010; 4:e783.

- Longley MS, Bennett SE, Mosbaug DW. Characterization of the 5' to 3' exonuclease associated with *Thermus aquaticus* RNA polymerase. *Nucleic Acid Res* 1990; 18:7317-22.
- Lorenz TC. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp* 2012; 22:e3998.
- Louis FJ, Büsher P, Lejon V. Diagnosis of human African trypanosomiasis. *Med Trop* 2001; 61: 340-346.
- MacLean LM, Odiit M, Chisi JE, Kennedy PG, Sternberg JM. Focus-specific clinical profiles in human African trypanosomiasis caused by *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4: e906.
- 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 Méd Trop* 1978; 58: 103–09.
- 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; 58:169–176.
- Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: apractical approach. *J Clin Lab Anal* 2002; 16:47-51.
- McCulloch R. Antigenic variation in African trypanosomes: monitoring progress. *Trends Parasitol* 2004; 20:117-21.
- Migchelsen SJ, Buscher P, Hoepelman AI, Schallig HD, Adams ER. Human African trypanosomiasis: a review of non-endemic cases in the past 20 years. *Int J Infect Dis* 2011; 15: e517–24.
- Migchelsen SJ, Büscher P, Hoepelman AI, Schallig HD, Adams ER. Human African trypanosomiasis: a review of non-endemic cases in the past 20 years. *Int J Infect Dis* 2011; 15:e517-24.
- Mitashi P, Hasker E, Mbo F, Van Geertruyden JP, Kaswa M, Lumbala C, *et al*. Integration of diagnosis and treatment of sleeping sickness in primary healthcare facilities in the Democratic Republic of the Congo. *Trop Med Int Health* 2015; 20:98-105.

- Mitashi P, Hasker E, Ngoyi DM, Pyana PP, Lejon V, Van der Veken W, *et al.* Diagnostic accuracy of loopamp *Trypanosoma brucei* detection kit for diagnosis of human African trypanosomiasis in clinical samples. PLoS Negl Trop Dis 2013; 7:e2504.
- Montalvo AM, De Armas Y, Fraga J, Blanco O, Menendez R, Montoto V, *et al.* Molecular and histological tools to diagnose an imported case of American cutaneous leishmaniasis in Cuba. Int J Dermatol 2015; 54:1175-9.
- Montalvo AM, Fraga J, Dujardin JC, Van der Auwera G. Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 RCPs for global *Leishmania* species identification. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012; 31:1453-61.
- Montalvo AM, Fraga J, El Safi A, Gramiccia M, Jaffe CL, Dujardin JC, *et al.* Direct *Leishmania* species typing in Old World clinical samples: evaluation of 3 sensitive methods based on the heat-shock protein 70 gene. Diagn Microbiol Infect Dis 2014; 80:35-9.
- Montalvo AM, Fraga J, Maes I, Dujardin JC, van der Auwera G. Three new sensitive and specific heat shock protein 70 RCPs for global *Leishmania* species identification. Eur J Clin Microb Infect Dis 2012; 31: 1453-61.
- Montalvo AM, Fraga J, Monzote L, Montano I, De Doncker S, Dujardin JC, *et al.* Heat-shock protein 70 RCP-RFLP: a universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World. Parasitology 2010; 137:1159-68.
- Montalvo AM, Fraga J, Tirado D, Blandón G, Alba A, Van der Auwera G, *et al.* Detection and identification of *Leishmania* spp.: application of two hsp70-based RCP-RFLP protocols to clinical samples from the New World. Parasitol Res 2017; 116:1843-8.
- Moser DR, Cook GA, Ochs DE, Bailey CP, McKane MR, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* subspecies by ADN amplification using the polymerase chain reaction. Parasitology 1989; 99:57-66.
- Mugasa CM, Adams ER, Boer KR, Dyserinck HC, Buscher P, *et al.* Diagnostic accuracy of molecular amplification tests for human African trypanosomiasis—systematic review. PLoS Negl Trop Dis 2012; 6: e1438.
- Mugasa CM, Laurent T, Schoone GJ, Kager PA, Lubega GW, Schallig HD. Nucleic acid sequence-based amplification with oligochromatography for detection of *Trypanosoma brucei* in clinical samples. J Clin Microbiol 2009; 47:630-5.

- Mugnier MR, Stebbins CE, Papavasiliou FN. Masters of Disguise: Antigenic Variation and the VSG Coat in *Trypanosoma brucei*. PLoS Pathog 2016; 12:e1005784.
- Mulumba MA, Kibonge MC, Mulumba MP, Musongela JP, Buscher P. Plaidoyer pour une nouvelle strategie transfusionelle en zone endemique de la trypanosomiase humaine africaine. Congo Médical 2005; 4: 99–106.
- Mumba Ngoyi D, Ali Ekangu R, Mumvemba Kodi MF, *et al.* Performance of parasitological and molecular techniques for the diagnosis and surveillance of *gambiense* sleeping sickness. PLoS Negl Trop Dis 2014; 8: e2954.
- Mumba Ngoyi D, Ali Ekangu R, Mumvemba Kodi MF, Pyana PP, Balharbi F, Decq M, *et al.* Performance of parasitological and molecular techniques for the diagnosis and surveillance of gambiense sleeping sickness. PLoS Negl Trop Dis 2014;8:e2954.
- Mymrikov EV, Seit-Nebi AS, Gusev NB. Large potentials of small heat shock proteins. Physiol Rev 2011;91:1123-59.
- Neuberger A, Meltzer E, Leshem E, Dickstein Y, Stienlauf S, Schwartz E. The changing epidemiology of human African trypanosomiasis among patients from nonendemic countries-1902-2012. PLoS One 2014; 9(2):e88647.
- Neuberger A, Meltzer E, Leshem E, Dickstein Y, Stienlauf S, Schwartz E. The changing epidemiology of human African trypanosomiasis among patients from nonendemic countries--1902-2012. PLoS One 2014; 9:e88647.
- Njamnshi AK, Seke Etet PF, Perrig S. Actigraphy in human African trypanosomiasis as a tool for objective clinical evaluation and monitoring: a pilot study. PLoS Negl Trop Dis 2012; 6: e1525.
- Njiokou F, Nimpaye H, Simo G, Njitchouang GR, Asonganyi T, Cuny G, Herder S. Domestic animals as potential reservoir hosts of *Trypanosoma brucei gambiense* in sleeping sickness foci in Cameroon. Parasite 2010; 17: 61–66.
- Njiru ZK, Mikosza AS, Armstrong T, Enyaru JC, Ndung'u JM, Thompson AR. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. PLoS Negl Trop Dis 2008;2:e147.
- Ooi CP, Bastin P. More TAHn meets the eye: understanding *Trypanosoma brucei* morphology in the tsetse. Front Cell Infect Microbiol 2013; 3:71.

- Pays E, Vanhollebeke B, Uzureau P, Lecordier L, Perez-Morga D. The molecular arms race between African trypanosomes and humans. *Nat Rev Microbiol* 2014; 12: 575–84.
- Peeling RW, Mabey D, Herring A, Hook EW 3rd. Why do we need quality-assured diagnostic tests for sexually transmitted infections? *Nat Rev Microbiol* 2006; 4:S7-19.
- Pepin J, Khonde N, Maiso F. Short-course eflornithine in Gambian trypanosomiasis: a multicentre randomized controlled trial. *Bull World Health Org* 2000; 78: 1284–95.
- Pepin 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.
- Picozzi K, Fèvre EM, Odiit M, *et al*. Sleeping sickness in Uganda: a thin line between two fatal diseases. *BMJ* 2005; 331: 1238–41.
- Pohlig G, Bernhard SC, Blum J. Efficacy and safety of pafuramidine versus pentamidine maleate for treatment of first stage sleeping sickness in a randomized, comparatorcontrolled, international phase 3 clinical trial. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10: e0004363.
- Pohlig G, Bernhard SC, Blum J. Efficacy and safety of pafuramidine versus pentamidine maleate for treatment of first stage sleeping sickness in a randomized, comparatorcontrolled, international phase 3 clinical trial. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10: e0004363.
- Priest, JW, Hajduk S. Developmental regulation of mitochondrial biogenesis in *Trypanosoma brucei*. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1994; 26: 179-19
- Priotto G, Kasparian S, Mutombo W. Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial. *Lancet* 2009; 374: 56–64.
- Priotto G, Pinoges L, Fursa IB. Safety and effectiveness of first line eflornithine for *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness in Sudan: cohort study. *BMJ* 2008; 336: 705–08.
- Radwanska M. Emerging trends in the diagnosis of Human African Trypanosomiasis. *Parasitology* 2010; 1977-1986.

- Requena JM, Montalvo AM, Fraga J. Molecular Chaperones of Leishmania: Central Players in Many Stress-Related and -Unrelated Physiological Processes. *Biomed Res Int* 2015; 301326.
- Ripamonti D, Massari M, Arici C, Gabbi E, Farina C, Brini M, *et al.* African sleeping sickness in tourists returning from Tanzania: the first 2 Italian cases from a small outbreak among European travelers. *Clin Infect Dis* 2002; 34:E18-22.
- Rocha G, Martins A, Gama G, Brandao F, Atouguia J. Possible cases of sexual and congenital transmission of sleeping sickness. *Lancet* 2004; **363**: 247.
- Ross R, Thomson D. A Case of Sleeping Sickness showing Regular Periodical Increase of the Parasites Disclosed. *Br Med J* 1910; 25;544-5.
- Rotureau B, Van Den Abbeele J. Through the dark continent: African trypanosome development in the tsetse fly. *Front Cell Infect Microbiol* 2013;3:53.
- Seixas JBA. Investigation on the encephalopathic syndrome during melarsoprol treatment of human African trypanosomiasis. PhD thesis, Universidade Nova de Lisboa, 2004.
- Shereni W, Anderson NE, Nyakupinda L, Cecchi G. Spatial distribution and trypanosome infection of tsetse flies in the sleeping sickness focus of Zimbabwe in Hurungwe District. *Parasit Vectors* 2016; 9:605.
- Simarro PP, Cecchi G, Franco JR, Paone M, Diarra A, Ruiz-Postigo JA, *et al.* Mapping the capacities of fixed health facilities to cover people at risk of gambiense human African trypanosomiasis. *Int J Health Geogr* 2014;13:4.
- Simarro PP, Cecchi G, Franco JR, Paone M, Diarra A, Ruiz-Postigo JA, *et al.* Mapping the capacities of fixed health facilities to cover people at risk of gambiense human African trypanosomiasis. *Int J Health Geogr* 2014; 13:4.
- Simarro PP, Franco JR, Cecchi G, Diarra A, Ruiz Postigo JA, Jannin JG. *et al.* Human African trypanosomiasis in non-endemic countries (2000-2010). *J Travel Med* 2012; 19: 44–53.
- Simarro PP, Franco JR, Cecchi G, Paone M, Diarra A, Ruiz Postigo JA, Jannin JG.. Human African trypanosomiasis in non-endemic countries (2000-2010). *J Travel Med* 2012; 19: 44–53.
- Simpson AG, Stevens JR, Lukeš J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol* 2006; 22, 168–174.

- Steffen C, Ankenbaver W, Poaver-Hofmann R, Bye S, Eisen D, Frey B, *et al.* En: Steffen C, ed. RCP Application Manual. 2nd ed. Mannheim: Roche Diagnostics 1999. p.10.
- Stevens J, Rambaut A. Evolutionary rate differences in trypanosomes. *Infect Genet Evol* 2001; 1: 143–150.
- Stevens JR, Gibson WC. The evolution of pathogenic trypanosomes. *Cad Saude Publica* 1999; 15:673-84.
- Stevens JR. Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. *Parasite* 2008; 15, 226–232.
- Steverding D. The history of African trypanosomiasis. *Parasit Vectors* 2008;1:3.
- Stijlemans B, Caljon G, Van Den Abbeele J, Van Ginderachter JA, Magez S, De Trez C. Immune Evasion Strategies of *Trypanosoma brucei* within the Mammalian Host: Progression to Pathogenicity. *Front Immunol* 2016; 7:233.
- Sudarshi D, Lawrence S, Pickrell WO, Eligar V, Walters R, Quaderi S, *et al.* Human African trypanosomiasis presenting at least 29 years after infection—wTAH can this teach us about the pathogenesis and control of this neglected tropical disease? *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8: e3349.
- Tiberti N, Hainard A, Lejon V, *et al.* Cerebrospinal fluid neopterin as a marker of the meningo-encephalitic stage of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness. *PLoS One* 2012; 7: e40909.
- Truc P, Lando A, Penchenier L, Vatunga G, Josenando T. Human African trypanosomiasis in Angola: clinical observations, treatment, and use of RCP for stage determination of early stage of the disease. *Trans R. Soc Trop Med Hyg* 2012; 106: 10-14.
- Truc P, Lejon V, Magnus E, Jamonneau V, Nangouma A, Verloo D, Penchenier L, Buscher P. Evaluation of the micro- CATT, CATT/*Trypanosoma brucei gambiense*, and LATEX/Tb *gambiense* methods for serodiagnosis and surveillance of human African trypanosomiasis in West and Central Africa. *Bull World Health Organ* 2002; 80:882–886
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 2012; 40:e115.
- Urech K, Neumayr A, Blum J. Sleeping sickness in travelers - do they really sleep? *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5:e1358.

- van der Meide WF, Schoone GJ, Faber WR, Zeegelaar JE, de Vries HJ, Ozbel Y, *et al.* Quantitative nucleic acid sequence-based assay as a new molecular tool for detection and quantification of *Leishmania* parasites in skin biopsy samples. *J Clin Microbiol* 2005; 43:5560-6.
- Veland N, Boggild AK, Valencia C, Valencia BM, Llanos-Cuentas A, Van der Auwera G, *et al.* *Leishmania* (*Viannia*) species identification on clinical samples from cutaneous leishmaniasis patients in Peru: assessment of a molecular stepwise approach. *J Clin Microbiol* 2012; 50:495-8.
- Vickerman K. Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. *Br Med Bull* 1985;41:105-14.
- Vickerman, K. The Diversity of the Kinetoplastid Flagellates. In: Lumsden, W.H.R., Evans, D.A. (Eds.), *Biology of the Kinetoplastida*. Academic Press, London/New York/San Francisco, 1976. pp. 1–34.
- Votýpka, J., d'Avila-Levy, C.M., Grellier, P., Maslov, D.A., Lukeš, J., Yurchenko, V. New approaches to systematics of Trypanosomatidae: criteria for taxonomic (re)description. *Trends Parasitol* 2015; 31:460–469.
- Weiss JB. ADN probes and RCP diagnosis of parasitic infections. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 313-30.
- WHO. Control and surveillance of African trypanosomiasis. Report of a WHO Expert Committee. WHO technical report series 881. Geneva: World Health Organization, 2017.
- WHO. Control and surveillance of human African trypanosomiasis. World Health Organ Tech Rep Ser 2013; 1–237.
- WHO. Human African trypanosomiasis: epidemiological situation. 2017. http://www.who.int/trypanosomiasis_african/country/en/(accessed June 14, 2017).
- WHO. Trypanosomiasis control manual. Geneva: African Medical and Research Foundation Nairobi, Kenya, 1983.
- Williams JF. Optimization strategies for the Polimerasa Chain Reaction. *Biotechniques* 1989; 7:762-9.
- Zhou X-H, Obuchowski NA, McClish DK. Statistical methods in diagnostic medicine. New York: John Wiley and Sons, 2002.