

Valor de la prueba del "Dye Test" (Reacción Anti-Crithidia) en el Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas Crónica*

Dr. Gustavo José Perruolo Laneti¹

La importancia de la enfermedad de Chagas, debido a su gran morbilidad en el continente americano, hace que día a día sean mayores los esfuerzos para perfeccionar y crear nuevas técnicas para el diagnóstico de esta enfermedad.

El interés práctico que tiene el diagnóstico de la enfermedad de Chagas obedece a varias causas: por una parte sus manifestaciones clínicas son muy diversas tanto en su forma aguda como en la crónica; por otra parte, en cada una de ellas la sintomatología puede ser muy variable. Esto hace, que en numerosas ocasiones el diagnóstico diferencial tropiece con muchas dificultades; algunas veces es un hallazgo de autopsia u ocasionalmente son los exámenes de laboratorio los que permiten aclarar el problema.

Además, debe ser considerada la larga duración de esta infección que puede persistir en el hombre por muchos años, en

* Tesis presentada ante la Ilustre Universidad de Los Andes, para optar al Título de Doctor en Bioanálisis.

¹ Profesor asistente de la Cátedra de Parasitología de la Fac. de Medicina de La Universidad del Zulia. Tesis doctoral.

una forma denominada latente o indeterminada, la cual a medida que el tiempo pasa o que se perfeccionan los métodos de investigación clínica van siendo evidenciados síntomas que antes no habían sido reconocidos.

Se ha destacado la gran utilidad que tienen para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, los exámenes complementarios, tales como: Electrocardiograma, examen radiológico y de menor importancia el Hematológico. Por otro lado tienen gran valor los datos epidemiológicos, particularmente: la procedencia de una zona reconocida como endémica de la enfermedad, tipo de habitación, infestación de la residencia por los transmisores y el reconocimiento por el paciente de los Hemípteros vectores.

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas puede hacerse por métodos parasitológicos y serológicos. Los métodos parasitológicos persiguen la demostración o aislamiento del parásito; los métodos serológicos, demostrar las modificaciones producidas en el organismo debido a la presencia del **Trypanosoma cruzi**.

El valor y aplicación de los métodos parasitológicos, dependen del período de evolución en que se encuentre la infección. Durante el período prepatente no pueden evidenciarse los parásitos; en el período patente es donde tienen mayor valor los métodos parasitológicos; en el período subpatente el valor de los métodos parasitológicos es de relativa importancia.

De los diversos métodos parasitológicos preconizados para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en su fase crónica, los más empleados son: I) Examen de sangre periférica (Examen al fresco y coloreados), II) Examen de sangre por concentración, III) Hemocultivo, IV) Inoculación en animales sensibles y V) Xenodiagnóstico.

I) **Examen de Sangre Periférica.**— Pifano¹, en examen de sangre periférica practicado en 157 pacientes obtuvo solo 5 casos positivos (3.18%); Mazza², considera despreciable esta técnica para el diagnóstico de la fase crónica, debido a la extrema escasez de los parásitos. Dias³, en examen de sangre periférica practicado a 113 pacientes sospechosos de infección chagásica no obtiene positividad.

La poca cantidad de hemoparásitos en la etapa crónica de la enfermedad, explica la baja positividad de la prueba, lo que según Pifano¹, se debe a tres posibilidades: a) "que la densidad hemoparasitaria de tripanosomas, sea tan escasa que resulta imposible evidenciar los parásitos en gota gruesa y extendido; b) que solamente exista la forma resistente del parásito en las fibras musculares (*Leishmania*) sin trypanosomas circulantes; c) que la infección se haya eliminado espontáneamente".

Algunos autores han preconizado los siguientes métodos de examen de sangre por **concentración** (II): Técnica de Martín-Leboeuf-Roubaud, con la cual Ramacciotti y cols.⁴, en 112 casos obtuvieron 12% de positividad en casos agudos. La "prueba del chipo" empleada por Díaz-Ungría⁵, en animales de experimentación con la cual obtuvo resultados más satisfactorios que con el examen directo de sangre al fresco, pero, empleando la misma prueba en pacientes chagásicos crónicos (8 casos), no obtuvo ningún resultado positivo.

III) **Hemocultivo**.— Pifano¹, empleando los medios de Davis y Razgha-Reichenow en 80 chagásicos crónicos obtuvo solo 5 cultivos positivos (6.25%). Pedreira de Freitas⁶, empleando los medios de Bonaci y N.N.N. en 37 pacientes con Machado-Guerreiro positivo no obtuvo casos positivos. Chiari y Brener⁷, empleando el medio L.I.T. (Liver infusion-tryptose) descrito por Yaeger, obtuvieron un 27.7% de positividad en 35 pacientes con Machado-Guerreiro positivo. Manso Soto y cols.⁸, cultivan en embrión de pollo cepas de **Trypanosoma cruzi**, pero no citan datos estadísticos. Pifano¹, considera que el diagnóstico por hemocultivo aporta porcentajes muy bajos ya que la posibilidad de aislar el **T. cruzi** en casos crónicos mediante este método está condicionado a factores muy diversos y en parte complejos, representados principalmente por densidad hemoparasitaria, potencial macrofágico de los leucocitos transportados, condiciones de los medios para satisfacer la actividad metabólica inicial de los parásitos sembrados y otros.

IV) **Inoculación**.— Pifano¹, inoculando perros y acures con sangre de 40 chagásicos crónicos sólo consiguió 5 perros positivos (12.5%). Pedreira de Freitas⁶, inoculando ratones blancos

con sangre total obtuvo un 0.6% de positividad, mientras que, inoculando con la "crema leucocitaria" obtuvo 3.1%. Mazza², refiere buenos resultados con la inoculación de sangre de chagásicos crónicos en animales sensibles, pero no cita porcentajes. Estos resultados nos indican que la inoculación no es un método recomendable en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas crónica.

V) **Xenodiagnóstico.**— Este método ideado por Brumpt en 1914⁹, para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en su fase crónica, todavía constituye uno de los mejores métodos para demostrar la existencia del *Trypanosoma* en la sangre periférica como lo demuestra los resultados obtenidos por los siguientes autores: Benaim y Drayer¹⁰, en 42 pacientes usando 6 a 10 ninfas obtuvieron 50% de positividad. Dias¹¹, en 42 pacientes usando 2 a 6 ninfas obtuvo 7.14% de positividad. Guerrero y cols.¹¹, en 9.149 casos encontraron un 30% de positividad. Jiménez¹², en 993 casos 6.70% de positividad. Maeckelt¹³, de 155 casos obtuvo 16.8% de positividad. Mazza¹⁴, de 181 casos 3.50% de positividad. Pifano¹, en 80 casos 33.80% de positividad. Pons¹⁵, de 4 casos obtuvo un 75% de positividad. Soto, R. y T. de Soto¹⁶, de 30 casos un 23% de positividad. Torrealba¹⁷, de 38 pacientes obtuvo 43.10% de positividad.

Ultimamente en el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina de La Universidad del Zulia, Soto, R.¹⁶, obtuvo 10 positivos (13.6%) a *Trypanosoma cruzi* en 73 pacientes usando un solo xenodiagnóstico.

Con respecto a los métodos serológicos se han empleado diversas técnicas diagnósticas como son: Reacción de Fijación del Complemento empleada por primera vez por Guerreiro y Machado¹⁸, en 1913. Reacción de Precipitina, Muniz en 1947²⁰. Hemaglutinación, Montañó y Ucros²¹. Aglutinación, Packchianian²². Hemólisis condicionada, Muniz²³. La Técnica de Coombs para la investigación de anticuerpos heterófilos, Nussenzweig y Faría²⁴. Investigación de Anticuerpos heterófilos, Muniz y Santos²⁵. Inmunofluorescencia, Sadun, Anderson, Williams²⁶, Camargo²⁷, Araujo y Batista²⁸, Loureiro de Souza y Camargo²⁹. Dye Test o Reacción Anti-Crithidia, Scorzo y Cols.³⁰.

Vistos los buenos resultados obtenidos por Scorza y cols.³⁰, con el Dye Test o Reacción Anti-Crithidia y considerando las ventajas que pueda tener esta prueba en el futuro, hemos hecho un estudio comparativo entre esta reacción y la de Fijación del Complemento, lo cual constituye el motivo del presente trabajo.

MATERIAL Y METODO

Se usó la técnica del "Dye test" de Sabin y Feldman³¹ para la Toxoplasmosis, aplicada a la investigación de la enfermedad de Chagas crónica usando los siguientes elementos:

Antígeno.— Se usó una cepa de *Trypanosoma cruzi* (Cepa Y) de origen braslero, aislada de un caso humano la cual inoculada en ratón blanco presenta las siguientes características: Corta duración del período prepatente (3 días según Barreto²), alta parasitemia (más de 100.000 por mm³ de sangre según Barreto²), un índice de letalidad del 100% e intenso parasitismo de los tejidos.

Esta cepa se mantiene en nuestro laboratorio en ratones blancos de 18 días, repicándolos cada 14 días, utilizando la "Prueba del Chipó" preconizada por Díaz-Ungria⁵, ya que el uso de esta prueba para extraer sangre de animales positivos e inocular la sangre ingerida por el insecto, en nuevos animales, constituye un método excelente y libre de riesgos para los pases por animales de las cepas de *T. cruzi*, con la ventaja de dejar vivos a los animales donantes, que pueden seguir en estudio.

La prueba consiste en hacer alimentar 2 a 3 Chipos (*Rhodnius prolixus*) en un ratón infectado con *T. cruzi*, inmediatamente después de la repleción se rompe el abdomen y la sangre que contenga se diluye en solución fisiológica; con una jeringa se recoge la sangre diluida y se inoculara medio centímetro cúbico por vía intraperitoneal a un ratón sano; se marca y se observa a los 5 a 10 días su índice de parasitemia.

Cultivo.— Hemos usado el medio L.I.T. (Liver infusion tryptose ideado por Yaeger, debido a que en las publicaciones de varios autores, empleando medios de cultivo diferentes: Pifano³, Davis y Razgha-Reichenow, Pedreira de Freitas⁶, Bonaci y N. N. N.

y Chiari y Brener⁷, L.I.T. se observa que este último medio es el que produce el mayor índice de positividad en hemocultivo de pacientes chagásicos y por lo tanto ofrece las mejores condiciones para la obtención del antígeno como son: ser un medio monofásico lo cual facilita toda su utilización, la gran cantidad de crecimiento del *T. cruzi* y su fácil preparación, la cual es la siguiente:

MEDIO DE L.I.T.
(Liver-infusion-tryptose)

TRIPTOSA	5.0 gr.
CLORURO DE SODIO	4.0 gr.
CLORURO DE POTASIO	0.4 gr.
FOSFATO ACIDO DISODICO (Na ₂ HPO ₄)	8.0 gr.
DEXTROSA	2.0 gr.
AGUA DESTILADA	1.000 ml.
LIVER INFUSION BROTH (Difco)	35.0 gr.

- 1) Disolver las sales.
- 2) Añadir el liver infusion broth.
- 3) Añadir hemoglobina en la proporción de 2%, esto es 20 ml. para cada litro de medio.
- 4) Ajustar a pH 7.2 con HCl o NaOH.
- 5) Filtrar por papel de filtro.
- 6) Distribuir en tubos de ensayo de preferencia con tapa de baquelita, 4 a 5 ml. por tubo. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos.
- 7) Guardar en nevera a 5°C.
- 8) En el momento de usar adicionar suero estéril de ternera en proporción de 10%, esto es 100 ml. para cada litro de medio.
- 9) Inactivar el medio en baño maría a 68°C durante una hora.

HEMOGLOBINA.— Preparación: 9 partes de agua destilada estéril a 1 parte de papilla de glóbulos rojos humano o de conejo, después que estén lisados centrifugar a alta velocidad y separar el sobrenadante que es el que se va a utilizar.

Consideraciones sobre la preparación del medio: a) Puede ser usado también suero de conejo con resultados semejantes al de ternera, también ya fue usado suero de buey conservado en congelación durante 5 años con buenos resultados. b) Con el "Bacto beef extract" (difco) se consiguen resultados similares a los obtenidos con el uso de la triptosa. c) Aumentando la cantidad de dextrosa aumenta el "growth rate", pero los cultivos se deterioran más rápidamente. d) El "liver infusion broth" de la Difco puede ser sustituido por el "Oxoid liver infusion" en la proporción de 1 gr. por litro de medio.

Yaeger³³ considera que es indispensable distribuir el medio de cultivo en frascos erlenmeyer de 125 ó 250 ml. para conseguir un crecimiento óptimo de la cepa de **Trypanosoma cruzi** a estudiar, por permitir este envase una mayor superficie que la que se consigue en los tubos de ensayo.

La siembra la realizamos a partir de sangre de ratón obtenida por corte de los vasos axilares usando heparina como anticoagulante, se siembra medio centímetro cúbico en cada tubo de medio y se incuba a 25°C por 10 a 14 días, al cabo de este tiempo se observa si la cantidad de trypanosomas es abundante para utilizarlo como antígeno en la prueba. Se centrifuga el tubo a 3.000 r.p.m. por 15 minutos y en el fondo del tubo se toma con pipeta la cantidad necesaria de Trypanosomas en suspensión para el montaje de la prueba.

Sueros.— Hemos usado esta reacción en cuatro grupos diferentes de personas

Grupo I.— Sueros de 7 pacientes con Machado-Guerreiro positivo y Xenodiagnóstico positivo a **T. cruzi**.

Grupo II.— Sueros de 57 pacientes con Machado-Guerreiro positivo y Xenodiagnóstico negativo.

Grupo III.— Sueros de 60 personas aparentemente sanas con Machado-Guerreiro negativo, de origen desconocido, donantes en el Banco de Sangre del Hospital Universitario.

Grupo IV.— Sueros de 6 pacientes con Leishmaniasis cutáneo-mucosa diagnosticados parasitológicamente por examen directo de frotis de la lesión.

Un suero de persona sana sin antecedentes epidemiológicos y con Machado-Guerreiro negativo y suero fresco de cobayo, que se usaron como controles negativos en la prueba.

Colorante.— Se utilizó el Azul de Metileno al 1:2.500 en una solución tamponada a pH 11 con Glicocola e Hidróxido de sodio.

Solución tamponada.

Solución de glicocola al 0.1 N 4.5 cc.
Solución de hidróxido de sodio al 0.1 N 5.5 cc.

Solución de glicocola al 0.1 N.

7.5 gr. de glicocola para 1.000 cc. de agua destilada. Esta solución debe mantenerse en refrigeración a 5°C para evitar su contaminación y deterioro.

Solución de Azul de Metileno.

Se prepara una solución al 0.25% en etanol de 98%.

Solución de azul de metileno al 1:2.500.

Solución tamponada 10 cc.
Solución de azul de metileno 2 cc.

Debe prepararse esta solución cada vez que sea necesario utilizarla, esto se debe a que esta solución de azul de metileno se inestabiliza al cabo de 48 horas.

Procedimiento de la reacción.

En la reacción puede utilizarse, láminas excavadas o tubos de hemólisis; nosotros utilizamos tubos de hemólisis, por ser más cómodo su manejo.

Mezclar en un tubo de hemólisis:

0.05 cc. de suero problema inactivado a 56°C por 30 minutos

0.10 cc. de suero fresco de cobayo conservado en refrigeración o suero de persona sana.

0.05 cc. de formas de cultivo de **T. cruzi** en forma de suspensión.

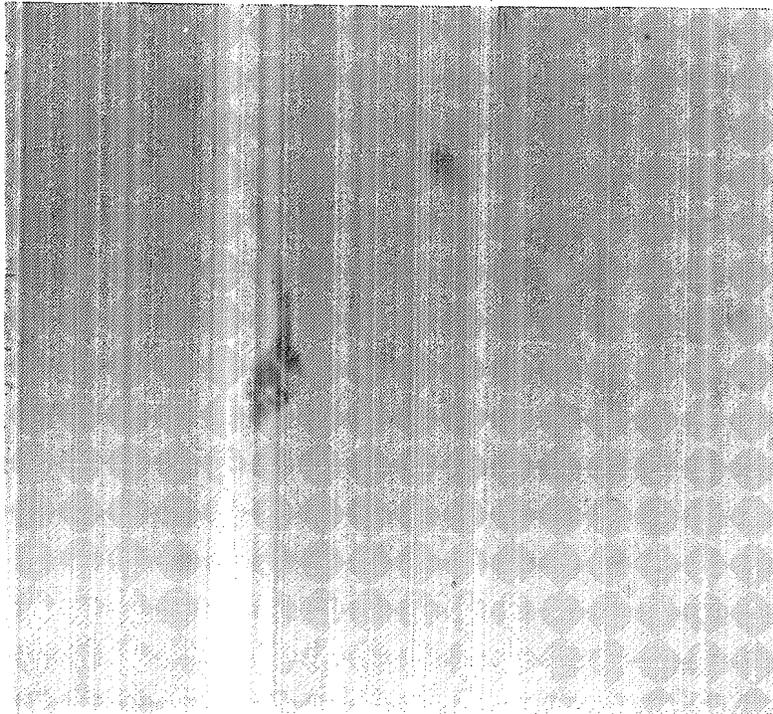


FOTO I.— Cribidia donde se observan las granulaciones citoplasmáticas coloreadas con el Azul de Metileno, después de ser incubada a 37°C por una hora, en presencia de un Suero **NEGATIVO** control.

Incubar la mezcla en baño maría a 37°C durante 60 minutos. Tomar con ayuda de un asa de platino o con pipeta fina, una gota de la mezcla incubada y adicionarle, sobre un portaobje-

tos un volumen igual de la solución de azul de metileno al 1:2.500. Cubrir la preparación con una laminilla vaselinada en sus bordes o simplemente colocar sobre ella un cubreobjetos y con la ayuda de un papel de filtro presionarla suavemente para eliminar el exceso de líquido.

Observar con objetivo de inmersión a 1.000 ó 1.200 aumentos; debe observarse 100 parásitos por lo menos, determinando en cada uno de ellos la presencia o ausencia de las granulaciones citoplasmáticas (Foto I y II).

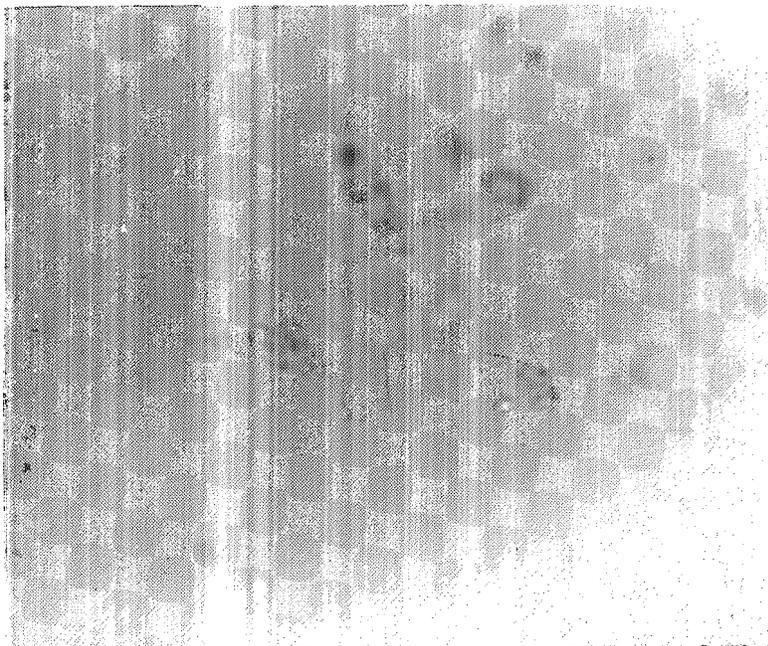


FOTO II.— Crithidia con las granulaciones citoplasmáticas sin colorear, después de ser expuesta en presencia de un suero POSITIVO. (La prueba del Dye test, es positiva si más del 60% de los parásitos observados, presentan estas características).

Se considera como positivo a todo suero que afecte a los parásitos de tal modo que más de un 60% de los mismos no muestren la tinción granular normal.

RESULTADOS

Como puede apreciarse en el cuadro I, la **Reacción del "Dye test"** o **Reacción Anti-Crithidia**, empleada por nosotros en siete pacientes con Machado-Guerreiro positiva y Xenodiagnóstico positivo, aportó un 100% de positividad; consideramos la reacción positiva cuando más del 60% de los parásitos observados son alterados por el colorante después de ser incubados por 60 minutos a 37°C en presencia del suero sospechoso. En este grupo hay un caso (P.C.) que lo consideramos positivo, aunque esté en el límite de la negatividad, por observar nosotros en el cuadro III que los negativos controles no pasan de 36% de los parásitos alterados por el colorante.

CUADRO I

SIETE PACIENTES CON REACCION DE MACHADO-GUERREIRO POSITIVO Y XENODIAGNOSTICO POSITIVO

Pacientes	Reacción de Dye test %
E.A.	94
C.G.	88
J.C.	80
J.C.R.	84
J.T.V.	87
J.V.	94
P.C.	62

En el cuadro I apreciamos que en 57 pacientes con Machado-Guerreiro positivo, sin comprobación de un xenodiagnóstico positivo, también logramos un 100% de positividad.

En los 60 pacientes con Machado Guerreiro negativo a los cuales se les practicó la prueba, obtuvimos un 0% de positividad como puede verse en el cuadro III.

En el cuadro IV mostramos el resultado obtenido en 6 pacientes con Leishmaniasis cutáneo-mucosa, diagnosticadas por obser-

vación de las Leishmanias en frotis de la lesión coloreado con Giemsa, a los cuales se les practicó la reacción del Dye test, para valorar la especificidad de la prueba, obteniendo un 0% de positividad.

CUADRO II

CINCUENTA Y SIETE PACIENTES CON MACHADO-GUERREIRO POSITIVO Y XENODIAGNOSTICO NEGATIVO

Pacientes	Reacción de Dye test %
R.M.	70
A.M.	99
M.M.	100
M.L.G.	100
J.L.	99
J.M.	100
J.R.A.	98
N.C.	96
L.R.	100
B.B.	97
R.C.	90
J.M.	80
E.G.	84
P.A.B.	99
C.M.	98
J.M.N.	87
M.S.	84
C.R.	95
J.L.	96
E.B.	94
M. de M.	97
E.R.	78
J.R.N.	94
J.U.	97
F.R.	87
A.G.	98

Pacientes	Reacción de Dye test %
G.L.	98
N.B.	90
F.M.V.	96
A.A.H.	88
A.M.H.	74
J.D.	92
R.J.P.	94
R.M.	90
G.A.P.	89
I.M.	100
C. de L.	99
F.C.	96
I.R.	89
V.A.	90
C.M.	96
A...	94
A.G.	98
L. de G.	100
O.C.	99
O.C.	99
M.C.	78
P.L.	94
S.P.	80
R.M.	89
J.D.	90
J.C.	96
N.M.	98
V.P.	92
J.C.	100
A.R.	100
L.H.	90
J.P.	98

CUADRO III

SESENTA PACIENTES CON REACCION DE MACHADO-GUERREIRO
NEGATIVO DONANTES DEL BANCO DE SANGRE DEL HOSPITAL
UNIVERSITARIO

Pacientes	Reacción de Dye test %
1	8
2	4
3	10
4	0
5	1
6	2
7	0
8	6
9	12
10	18
11	14
12	20
13	5
14	7
15	16
16	10
17	9
18	1
19	0
20	0
21	0
22	10
23	4
24	8
25	3
26	16
27	20
28	4
29	12
30	5
31	24

Pacientes	Reacción de Dye test %
32	36
33	2
34	10
35	5
36	4
37	30
38	14
39	5
40	8
41	16
42	14
43	32
44	5
45	0
46	4
47	8
48	0
49	2
50	4
51	10
52	1
53	2
54	0
55	6
56	8
57	4
58	0
59	8
60	1

CUADRO IV

SEIS PACIENTES CON LEISHMANIASIS CUTANEO-MUCOSA

Pacientes	Reacción de Dye test %
G.A.A.	14
P.B.	18
E.B.	24
R.R.	8
G.A.	10
J.C.	6

COMENTARIOS Y CONCLUSIONES

En vista de los resultados obtenidos por nosotros con la **prueba del Dye test** para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas en su fase crónica, y conocidos los resultados obtenidos por diversos autores con diferentes pruebas serológicas, consideramos necesario hacer algunos comentarios sobre el valor y oportunidad de cada una de ellas y una comparación con nuestros resultados.

Entre las pruebas serológicas empleadas podemos citar: 1) **Reacción de fijación del complemento.**— Guerreiro y Machado¹⁹, en 1913 fueron los primeros en demostrar la existencia de anticuerpos específicos en sueros de portadores de tripanosomiasis americana utilizaron la Reacción de Fijación del complemento, empleando como antígeno un extracto acuoso glicerinado de órganos de animales, de preferencia perros, inoculados con **Trypanosoma cruzi**. Posteriormente otros tipos de antígenos han sido empleados, hasta el presente, de todos los antígenos propuestos el mejor es el constituido por formas de cultivo obtenidas en condiciones óptimas de crecimiento, liofilizados y mantenidos en ampollas a -30°C . Este tipo de antígeno posee la gran ventaja de mostrarse inalterado y poder ser empleado dentro de una concentración exacta.

Tratando de llegar a un antígeno ideal para la Reacción de Fijación del complemento, diferentes autores han experimentado fraccionar el antígeno, llegándose a obtener resultados poco halagadores, lo que comprueba la verdad de una regla general en inmunología, que nos enseña "que siempre se disminuye la sensibilidad de un antígeno por su fraccionamiento". Maekelt³⁴, 1962, entre las fracciones proteicas de **Trypanosoma cruzi** siempre encontró menor fijación específica que en los antígenos preparados del parásito entero. Fife y Kent³⁵, 1960, hacen un fraccionamiento modificado, cloroformo-gel aplicado a extracto de trypanosoma por purificación con éter, obteniendo un antígeno, con una aparente, libre actividad no específica y anticomplementaria. Estos autores hacen una excepción de la regla, lo que explica la complejidad antigénica del **Trypanosoma cruzi**.

Los trabajos de diversos autores, no dan una idea exacta sobre la especificidad de la Reacción de Fijación del Complemento. Maekelt y Díaz³⁶, 1963, comprobaron la alta sensibilidad y especificidad del antígeno de **T. cruzi**, utilizando la reacción de fijación del complemento para el diagnóstico de la infección chagásica que no da reacciones cruzadas en personas infectadas con **Trypanosoma rangeli**, reportando un 92 y 93.5% de positividad en sueros de pacientes chagásicos comprobados parasitológicamente. Freitas³⁷, obtiene un 97.3% de positividad en pacientes chagásicos comprobados parasitológicamente y siempre negativo en controles efectuados con personas sanas o portadoras de otras enfermedades. Oliveira de Almeida³⁸, 1964, por lo contrario, en 2.433 casos de Lepra lepromatosa dieron un 10.89% positivos a la reacción de fijación del complemento para Chagas.

En cuanto a la sensibilidad de esta reacción, consideramos los datos de los siguientes autores: Alves de Lima y cols.³⁹, 1967, en 1.230 donantes de sangre encontraron 13.8% de positividad. Jacomo⁴⁰, 1950, en 1.949 sueros obtuvo 52.6% de positividad. Mora y cols.⁴¹, 1960, de 1.659 sueros obtuvieron un 8.2% de positividad. Freitas y cols.⁴², 1952, en 1.522 reacciones obtuvieron 2.2% de positividad. Maekelt⁴³, 1959 en 441 sueros obtuvo 12.2% de positividad. Durval⁴⁴, 1959, en 3.267 sueros obtuvo 17.27% de positividad. Mora⁴⁵, 1964, en 17.061 sueros obtuvo

un 7.0% de positividad. Cornejo y cols.⁴⁶, 1962, en 199 sueros obtuvieron 8 casos positivos y dos casos con xenodiagnósticos positivo. Pinto⁴⁷, 1957, en 579 sueros fueron positivos un 7.25%. Corredor y cols.⁴⁸, 1965, en 1.182 sueros encontraron 2.2% de positividad. Knieri⁴⁹, 1959, en 29 individuos con xenodiagnóstico positivo obtuvo un 70% de positividad, 7% dudosos y un 3% negativo con la reacción de fijación del complemento. Núñez y cols.⁵⁰, en 28.816 donantes del banco de sangre del Estado Zulia, comprobaron un 2.26% de positividad.

De los resultados obtenidos por los diferentes autores, referente a la especificidad y la sensibilidad, se ha llegado a la conclusión que hasta el presente la Reacción de Fijación del Complemento (Reacción de Machado-Guerreiro) se puede considerar como una prueba sensible y específica para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en su fase crónica, a pesar de la discrepancia en los valores obtenidos por los diversos autores.

2) **Precipitación.**— Esta prueba consiste en demostrar la presencia de anticuerpos (Precipitinas), que forman complejos con las moléculas de antígeno en solución, estratificando el antígeno en un tubo sobre un pequeño volumen de antisuero; en la interfase de los dos reactivos ocurre la precipitación en forma de anillo. Esta prueba demuestra la presencia de una reacción antígeno-anticuerpo, pero no indica si están presentes uno o varios sistemas antígeno-anticuerpos. Esta reacción requiere la presencia de sales y un pH cercano a la neutralidad.

Muniz²⁰, 1947, usando esta prueba en 32 casos de enfermedad de Chagas en su fase aguda obtuvo un 100% de positividad y en 200 casos de pacientes chagásicos crónicos obtiene un 18% de positividad, llegando a la conclusión de que hay un elevado tenor de inmunosuero (Aglutininas y Precipitinas) en el período inicial (Fase aguda) de la enfermedad de Chagas, seguido de una caída progresiva de este título, con el paso de la infección a la fase crónica.

El autor considera que esta prueba es de gran valor en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en su fase aguda, y demuestra las ventajas de esta técnica como método de diagnóstico, señalando en el mismo trabajo los siguientes puntos:

- a) Técnica de la reacción extremadamente simple.
- b) Precipitinógeno estable y de larga duración después de ser guardado libre de contaminación.
- c) Cantidades mínimas de suero para la reacción (0.2 ml).
- d) Resultados inmediatos, pues la mayoría de los sueros en casos agudos, reaccionan en los primeros minutos.
- e) Absoluta especificidad, porque en casos de Leishmaniasis cutáneo-mucosa y Leishmaniasis visceral Americana, no reaccionan debido a la baja concentración de anticuerpos que ellos poseen.
- f) Gran utilidad en encuestas epidemiológicas para evidenciar casos nuevos (Agudos y Subagudos) de la enfermedad.

Pellegrino⁵¹, 1953, describe una técnica simplificada para la prueba de Precipitina con fracción polisacárida extraída de cultivos de **Trypanosoma cruzi**, y la aplica en 12 perros infestados experimentalmente, constatando la presencia de anticuerpos precipitantes en sueros de 11 de ellos, coincidiendo tal hecho con la aparición de Trypanosomas en sangre circulante, 15 a 25 días después de la inoculación.

Estos resultados traen a consideración que los anticuerpos del tipo Precipitina, abundantes en las primeras fases de la enfermedad de Chagas, tienden a desaparecer, llegando a títulos tan bajos en su concentración que la prueba se hace negativa, siendo los anticuerpos revelados únicamente por las reacciones del tipo Fijación del Complemento y otras reacciones con sensibilidad y especificidad más acentuada que permiten poner de manifiesto la poca cantidad de anticuerpos presentes en esta fase de la enfermedad de Chagas.

3) **Aglutinación.**— **Muniz y Freitas**⁵², demostraron que sueros de portadores de trypanosomiasis Americana, en fase aguda, aglutinan formas de cultivo de **Leishmania brasiliensis**, mientras que sueros de portadores de Leishmaniasis cutáneo-mucosa, dotados de bajo poder aglutinante para las especies homólogas, están prácticamente desprovistos de poder aglutinante para las formas de cultivo de **Trypanosoma cruzi**; basándose en este es-

tudio, comprueban que en 6 casos agudos estudiados, los títulos aglutinantes variaban entre 1:2.560 a 1:10.240 y en 24 casos crónicos de enfermedad de Chagas, los títulos observados fueron entre 1:160 y 1:2.560.

Posteriormente⁵, estudian 211 casos crónicos diagnosticados por la Reacción de Fijación del Complemento, constatando que títulos más bajos de 1:160 podían ser observados, tales como 1:80 y 1:40 que fue el 15% del total observado, tornándose difícil en estos casos decir la positividad de la reacción, en vista de que sueros de individuos no portadores de Tripanosomiasis Americana, pueden aglutinar formas de cultivo de **Trypanosoma cruzi** a estas diluciones.

Hauschka⁵⁴, en un paciente cuya infección tenía 30 años de evolución, el título aglutinante fue de 1:640, comprobando lo que Muniz y Freitas habían señalado en trabajo anterior, esto es, que sueros de casos crónicos de enfermedad de Chagas pueden ejercer actividad aglutinante sobre las formas de cultivo de **Trypanosoma cruzi**.

Goble⁵⁵, constató que el poder aglutinante de sueros de perros normales sobre cultivos de **Trypanosoma cruzi** daban un título de 1:200, obteniendo títulos un poco mayores en el período patente, algunos días después de ser inoculados con **Trypanosoma cruzi**. Según estos resultados la **prueba de Aglutinación** es de poco valor en experimentación de la enfermedad de Chagas en animales.

Una de las dificultades de esta prueba es que no todas las cepas de **T. cruzi** pueden ser utilizadas, por presentar aglutinación espontánea cuando están suspendidas en soluciones que contengan electrolitos (NaCl), siendo los cultivos en medio líquido los que han mostrado mayor tendencia a presentar este fenómeno.

En vista de estas dificultades, Nussenzweig y Faría²⁴, con el fin de mejorar la técnica de la **prueba de Aglutinación**, procuran introducir la prueba de Antiglobulinas (Prueba de Coombs indirecta).

Controlando con la Reacción de Fijación del Complemento, verificaron que en 61 sueros positivos para la Reacción de Fijación del Complemento, 60 presentaron la Prueba de Coombs positiva. Esto tiene el inconveniente de hacer pruebas de Coombs rutinarias y la necesidad de usar parásitos vivos como antígeno.

4) **Prueba de Hemólisis Condicionada.** La absorción de hematíes del poliósico de **Trypanosoma cruzi** con el fin de estudiar el comportamiento de los hematíes sensibilizados en presencia de sueros de individuos portadores de Tripanosomiasis Americana en la prueba de la Hemaglutinación llevó a Muniz⁵⁶, a observar la ocurrencia de hemólisis cuando usaba hematíes del propio enfermo en presencia del mismo suero pero no inactivado. Diferentes pruebas permitieron a Muniz caracterizar el fenómeno observado, como una reacción antígeno-anticuerpo representada por la fracción absorbida y el anticuerpo específico en presencia del complemento. Como la especificidad de los hematíes no interviene en el fenómeno, Muniz le dio el nombre de **Hemólisis Condicionada**. Este fenómeno es de carácter general.

Almeida y Azevedo⁵⁷, estudiando comparativamente la **Hemólisis Condicionada** y la hemólisis específica demostraron su semejanza, en vista de seguir leyes y presentar idéntica relación entre los elementos de la reacción.

Como había sido demostrado por la reacción de la Hemólisis Condicionada que la fracción poliósida del **Trypanosoma cruzi** reaccionaba con antígenos heterófilos del tipo Forssmann y de la Mononucleosis se hizo necesaria la absorción previa con riñón de cobayo, hematíes de carnero y hematíes de buey de los sueros a investigar, con el fin de retirar los anticuerpos no específicos.

Aun cuando la técnica de la hemólisis condicionada sea extremadamente simple, pues puede ser hecha utilizando hematíes del propio paciente o del tipo "O", así como hematíes de carnero o de cobayo, la operación de absorción, torna a los sueros muchas veces altamente independientes, interfiriendo de esa manera los resultados.

El cislamiento y el empleo de una fracción no reactiva con anticuerpos heterófilos podrá transformar la **Hemólisis Condicionada**, en un valioso método en las investigaciones de portadores de infección chagásica.

Henderson-Begg⁵⁸, demostraron la existencia de **aglutininas de tipo heterófilo** en títulos bastante elevados en casos de Tripanosomiasis Africana y comprobaron que eran absorbidos parcialmente por glóbulos rojos de buey y con pulpa de riñón de cobayo.

Goes⁵⁹, Goes y Bruno⁶⁰, practicaron la reacción de Paul Bunnell-Davidsohn en sueros de 5 pacientes con enfermedad de Chagas, encontrando títulos aglutinantes variables de 1:112 a 1:222 y concluyen que son aglutininas del tipo Forssmann, por ser absorbidas en un 86 a 100% por la suspensión de riñón de cobayo.

Muniz y Santos²⁵, investigan la presencia de hemolisinas y aglutininas para los glóbulos rojos de carnero en sueros de individuos portadores de Trypanosomiasis Americana tanto en su fase aguda como en la crónica; observando que en 15 sueros de casos agudos los títulos de aglutininas fueron entre 1:640 a 1:2560 y los de hemolisinas, títulos de 1:640 a 1:5120.

En 50 casos crónicos obtuvo títulos de aglutininas entre 1:20 a 1:640 y títulos de hemolisinas entre 1:20 a 1:1280.

Basándose en resultados de una serie de ensayos estos autores concluyen:

a) Que las aglutininas y hemolisinas de tipo heterófilas se encuentran en sueros de individuos portadores de Tripanosomiasis Americana.

b) Que los títulos hemolíticos encontrados se mostraron muchas veces superior a los títulos aglutinantes.

c) Que en la fase aguda de la enfermedad de Chagas los títulos encontrados, de hemolisinas como de aglutininas heterófilas, son más elevados que en la fase crónica.

d) Que la caída del poder aglutinante específico es seguida de una baja en los títulos de los anticuerpos heterófilos.

e) Que las hemolisinas y aglutininas heterófilas, presentes en el suero de individuos portadores de la enfermedad de Chagas son absorbidos intensamente con pulpa de riñón de cobayo y con menor intensidad por glóbulos rojos de buey.

f) La absorción con un antígeno específico (formas de cultivo de **Trypanosoma cruzi**), aunque retire las aglutininas específicas para el parásito, causa solamente una pequeña disminución en cantidad de anticuerpos de tipo heterófilo, y que la absorción con pulpa de riñón de cobayo, aunque elimina los anticuerpos de tipo heterófilo, determina solamente una pequeña variación en los títulos aglutinantes específicos (formas de cultivo de **T. cruzi**).

g) Que para la Reacción de la Hemólisis Condicionada se ha demostrado que los anticuerpos heterófilos del tipo Forssmann (100% absorbidos con pulpa de riñón de cobayo) y del tipo de la Mononucleosis absorbidos parcialmente con riñón de cobayo y 100% con hematíes de carnero), existentes en sueros de individuos no portadores de Tripanosomiasis Americana, eran capaces de reaccionar con la fracción poliósida extraída de formas de cultivo de **Trypanosoma cruzi**; este dato demuestra la existencia en la estructura antigénica del **T. cruzi**, de componentes capaces de reaccionar con este tipo de anticuerpo.

h) Que tomando en consideración que los anticuerpos de tipo heterófilo son capaces de reaccionar en la Reacción de Fijación del Complemento con antígenos de ese grupo, invalida el empleo de este tipo de reacción, de antígenos preparados con órganos de animales pertenecientes al "grupo cobayo" con la finalidad de diagnosticar enfermedades parasitarias las cuales contienen muchas veces anticuerpos heterófilos en elevadas concentraciones.

5) **Reacción de Hemaglutinación.** Hematíes tratados con extractos de células bacterianas, rickettsias, hongos patógenos, protozoarios, o con extractos purificados de polisacáridos o proteínas, constituye un reactivo muy sensible para detectar y titular los correspondientes anticuerpos. Si estos hematíes son pre-tratados con ácido tánico absorben proteínas rápidamente y pue-

den ser utilizados para titular anticuerpos presentes en muy pequeñas concentraciones en el diagnóstico de sueros.

Las células tratadas con ácido tánico también absorben polisacáridos, pero no tan rápidamente como a las proteínas. Tomando en cuenta estos conocimientos se ha aplicado en el diagnóstico serológico de diversas enfermedades, dándole a este fenómeno el nombre de **Reacción de Hemaglutinación**.

En el campo de la Parasitología fueron Jacobs y Lunde⁶¹, 1957 quienes aplican la reacción de hemaglutinación para la Toxoplasmosis; Kagan⁶², 1957 la aplica en el diagnóstico de la Ascariasis; Kagan y Oliver-González⁶³ 1958 la experimentan con Schistosomiasis; Knerim y Niedmann⁶⁴ 1961 la aplican en el diagnóstico de la Hidatidosis; es en 1962 cuando Cerisola, Chaben y Lazzari⁶⁵, la aplican al diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas.

Montaño y Ucos²¹ 1965, en un estudio comparativo entre la Reacción de Fijación del Complemento y la Reacción de Hemaglutinación consiguen una positividad en el 2.1% de los pacientes con Machado-Guerreiro negativo y diagnóstico parasitológico positivo; el 1.1% de los casos con Machado Guerreiro positivo dieron hemaglutinación negativa, además le atribuyen como ventaja el hecho de permitir estudiar los sueros anticomplementarios, impidiendo que se dejen de diagnosticar algunas infecciones, ya que consiguieron que de 72 sueros anticomplementarios, 16 (22.2%) dieron Reacción de Hemaglutinación positiva y 5 de ellos la dieron dudosa.

No está claramente establecida su especificidad para la enfermedad de Chagas, la mayoría de los autores consideran que es similar a la Reacción de Fijación del Complemento.

Cerisola y cols.⁶⁶ 1969, estudiando 24 enfermos chagásicos en período agudo, que no recibieron tratamiento específico, practicándoles un estudio serológico seriado a través del tiempo hasta los 15 meses, con las técnicas de Machado-Guerreiro, Hemaglutinación e Inmunofluorescencia, para valorar la sensibilidad de las tres técnicas serológicas y la duración de la etapa preserológica de la enfermedad de Chagas valorada por cada uno de los métodos. Se puede observar en los datos obtenidos en este es-

tudio que la reacción de Fijación del Complemento practicado en el primer mes después del diagnóstico parasitológico, da un 40% de positivos; en la reacción de Hemaglutinación un 38.9% de positividad y en la reacción de Inmunofluorescencia un 100%; esto nos indica que la reacción de Inmunofluorescencia presenta el período serológico más breve.

En el segundo, tercero y cuarto mes de evolución la reacción de Fijación del Complemento dio 66.7%, 60% y 90% respectivamente; la reacción de Hemaglutinación dio un 42.1%, 81.3% y 80% de positividad, lo que indica que durante los primeros meses de la enfermedad de Chagas la reacción de Fijación del Complemento es ligeramente más sensible que la reacción de Hemaglutinación.

Al quinto mes de evolución de la enfermedad las reacciones de Fijación del Complemento, la de Hemaglutinación y la de Inmunofluorescencia se mostraron positivas en el 100% de los casos.

Del noveno mes en adelante la reacción de Hemaglutinación y la de Inmunofluorescencia tienen una sensibilidad del 100%; la reacción de Fijación del Complemento es ligeramente menos sensible con la técnica empleada por ellos.

Del comportamiento diferente de las tres técnicas serológicas practicadas en pacientes en período agudo, surge la necesidad de recomendar su utilización conjunta cuando se pretenda evaluar la efectividad de terapéuticas específicas para la enfermedad de Chagas.

6) **Reacción de Inmunofluorescencia.** Coombs⁶⁷ 1941, describió el método de conjugación del anticuerpo con colorantes fluorescentes que permite observar al microscopio la unión antígeno-anticuerpo, denunciada por la fluorescencia que adquiere el elemento antigénico al fijarse en él el anticuerpo fluorescente. El principio de este método de Coombs consiste en la afinidad de las proteínas por ciertos colorantes fluorescentes sin perder sus propiedades inmunológicas, pudiendo por lo tanto, actuar normalmente y unirse al antígeno específico.

Fife y Muschel⁶⁸ utilizando Tripanosomas de cultivo como antígeno, describen un test de inmunofluorescencia en tubo para la enfermedad de Chagas. Estudiando 40 sueros de chagásicos, la **Reacción de Inmunofluorescencia** dio resultados levemente superiores a la Reacción de Fijación del Complemento, en sueros de Sifilíticos (20 casos) y de presuntos sanos (70 casos), solamente 5 casos de reactividad dudosa. Sin embargo, la técnica que describen no es práctica, y demanda mucho trabajo y gastos.

Voller⁶⁹, consigue buenos resultados con un antígeno de formas de cultivo de **Trypanosoma cruzi** fijadas en portaobjetos.

Biagi, Tay y Murray⁷⁰, utilizan como antígeno formas leishmanioides de miocardio de ratón infectado por **T. cruzi**. Los resultados de esta técnica son notablemente concordantes con la reacción de Fijación de Complemento en un total de 236 sueros estudiados.

Camargo²⁷, describe la técnica con formas de cultivo formalizadas en portaobjetos, con la que encuentra una correlación absoluta entre la **Reacción de Inmunofluorescencia** y la Reacción de Fijación del Complemento en 494 sueros no reactivos y en 48 reactivos. Sin embargo, en un grupo de sueros con reacción de Fijación del Complemento practicada con otra técnica, de 394 con R.F.C. negativa resultaron 392 reacciones de Inmunofluorescencia negativas y sólo 2 positivas; en 130 sueros con R.F.C. positiva encuentra la reacción de Inmunofluorescencia positiva en todos, y en un grupo de 10 sueros anticomplementarios la reacción de Inmunofluorescencia dio positiva en 8 y negativa en 2. Por otra parte, estudiando un grupo de pacientes con Leishmaniasis cutáneo-mucosa la positividad llegó al 100%. Aunque en estos pocos casos no se ha descartado la coexistencia de la enfermedad de Chagas, los resultados positivos de la reacción de Inmunofluorescencia hacen presumir la inespecificidad de la técnica frente a estas dos enfermedades.

Souza y Camargo²⁹, usan en vez de suero, sangre tomada por venipunción y punción en el dedo, recogida en papel de filtro, diluida en solución salina tamponada; la sangre recogida en el papel de filtro no mostró pérdida de actividad cuando fue

mantenida seca hasta 30 días a temperatura ambiente. Este hecho le da una gran ventaja a esta prueba, y que puede permitir estudios serológicos en encuestas epidemiológicas en el campo, sin encontrarse con los inconvenientes de conservación de sueros que tienen las otras pruebas que se usan en el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas.

Corredor y cols.⁷¹, en 186 sueros, practicaron la R.F.C. y la reacción de Inmunofluorescencia llegando a la conclusión que las dos no son estadísticamente equivalentes y por lo tanto la Inmunofluorescencia no es recomendable por estar demostrado que la R.F.C. del 50% de hemólisis tiene una sensibilidad del 97.2% y una especificidad de casi el 99%.

Toussaint y cols.⁷², usando antígeno (glucoproteínas) somático del *T. cruzi* (SAFA) comprobaron que era más sensible que la R.F.C. y tan específica como la reacción de Inmunofluorescencia indirecta usando como antígeno cultivos de *T. cruzi*.

Sadun y cols.⁴¹ usando gotas de sangre con Tripanosomas como antígeno, consiguieron reacciones cruzadas con otras Tripanosomiasis (sueros de pacientes con tres especies de Tripanosoma); con otras enfermedades encontraron relativa menor cantidad de reacciones cruzadas, lo que indica un alto grado de especificidad.

Araújo y Batista²⁸, empleando la técnica indirecta comparan la Inmunofluorescencia con la Reacción de Machado-Guerreiro y consideran la primera más sensible y específica para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, ya que fue capaz de revelar todos los positivos en una sola reacción, mientras que la R.F.C. necesitó ser repetida en muchos casos; la mayor sensibilidad queda demostrada al ser capaz de evidenciar positivos en diluciones mucho más altas que los observados con la reacción de Machado-Guerreiro. Consideran que la Inmunofluorescencia presenta menos causas de error, tanto en la lectura como en la interpretación, por el hecho de que la emplearon en 22 muestras con R.F.C. dudosa o no reactiva, logrando con la Inmunofluorescencia 21 positivos.

Alvares, Cerisola y Rohwedder⁷³, en 851 sueros de pacientes en período crónico de la enfermedad de Chagas, practicaron las reacciones de Inmunofluorescencia, Hemaglutinación y Fijación del Complemento, en 241 sueros con R.F.C. y R.H.A. positivas y en las cuales la reacción de Inmunofluorescencia fue positiva en 240 sueros y negativa en 1; y 610 sueros con ambas reacciones concomitantemente negativas en donde la reacción de Inmunofluorescencia resultó negativa en todos los casos; puede afirmarse que la **Reacción de Inmunofluorescencia** brinda resultados similares a los conseguidos con las reacciones de Hemaglutinación y Fijación del Complemento cuando se practica en pacientes chagásicos crónicos.

Apesar de la discordancia sobre el valor de esta prueba, se puede considerar que el principio moderno de las técnicas diagnósticas por Anticuerpos fluorescentes es perfectamente aplicable al diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Considerando que su sensibilidad es similar a la reacción de Hemaglutinación y ligeramente superior a la reacción de Fijación del Complemento en el período crónico; en el agudo, es la prueba diagnóstica más precoz en hacerse positiva, aventajando de esta manera en sensibilidad a las otras.

7) **Reacción del Dye test o Reacción Anti-Crithidia.**— En 1959 Scorza y cols.³⁰, aplicaron dicha prueba en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, basándose en los resultados obtenidos por Muniz y Borisello⁷⁴ 1945, Silva⁷⁵ 1955 y Rubio⁷⁶ 1956, quienes estudiaron la acción lítica de sueros normales e inmunes de diferentes animales sobre las formas de cultivo de **Trypanosoma cruzi**, observando que:

a) Al incubar durante 2 horas a 37°C una mezcla de suero humano fresco con formas de cultivo de **Trypanosoma cruzi**, estas se hacen globositas, leishmanioides, perdiendo su refringencia citoplasmática, culminado el proceso con la lisis de ellas.

b) La acción lítica de los sueros se atenúa cuando se inactivan previamente por calentamiento moderado.

c) La adición de suero sano fresco a los sueros inmunes inactivados, restituye la acción lítica de éstos. Esto significa que la

propiedad anti-crithidia de los sueros inmunes se pierde por inactivación y se restituye con la adición de suero fresco, lo cual permite deducir que el factor anti-crithidia es termoestable y requiere para su actividad una fracción termolábil presente tanto en los sueros normales como en los inmunes.

d) La acción lítica desapareció al destruir C'1, no importando en cambio, la falta de C'2 y C'4, lo que explicaría la identidad de la fracción termolábil del factor Anti-Crithidia.

Scorza y cols.⁹, comparando los resultados obtenidos con este test y la reacción de Fijación del Complemento encontraron un 100% de positividad en 28 casos de Enfermedad de Chagas crónica, diagnosticados con xenodiagnóstico positivo a **Trypanosoma cruzi**; en cuanto a su sensibilidad, la encontraron superior a la de la reacción de Fijación del Complemento, ya que de los 28 sueros con "Dye test" positivo, la reacción de Fijación del Complemento dio 21 reacciones positivas y 7 negativas (25%). En un caso, con xenodiagnóstico positivo a **T. rangeli** dio la **Reacción Anti-crithidia** negativa y reacción de Fijación del Complemento negativo, este dato da una idea sobre la especificidad de esta prueba.

Amato⁷⁷, refiere haber practicado esta reacción en casos de Enfermedad de Chagas, Leishmaniasis visceral y Leishmaniasis cutáneo-mucosa sin obtener resultados satisfactorios.

Nosotros practicamos la **reacción Anti-crithidia** en 7 casos con reacción de Fijación del Complemento positiva y xenodiagnóstico positivo, y obtuvimos un 100% de positividad, estos sueros nos sirvieron como patrón positivo en la reacción ya que estábamos seguros de su positividad con el xenodiagnóstico positivo a **Trypanosoma cruzi**.

Después de familiarizarnos con la técnica, siguiendo los resultados del 100% de positividad obtenidos de los 7 casos diagnosticados con xenodiagnóstico positivo en los cuales más del 60% de los parásitos observados presentaban alteraciones en la coloración de las granulaciones en el citoplasma, la practicamos en 57 pacientes diagásicos crónicos diagnosticados por medio de

la Reacción de Fijación del Complemento, con resultados 100% positivos.

Para comprobar su especificidad, practicamos la prueba a 60 pacientes con Machado-Guerreiro negativo, donantes del Banco de Sangre del Hospital Universitario, y 6 pacientes con Leishmaniasis cutáneo-mucosa, en todos los casos la reacción fue negativa, lo que demuestra la especificidad de la reacción.

Basándonos en los resultados obtenidos podemos llegar a las siguientes conclusiones:

a) La prueba es de fácil realización, y exige muy poco tiempo para diagnosticar un caso crónico de Enfermedad de Chagas, mientras que la reacción de Machado-Guerreiro, es una prueba complicada y su realización dura un tiempo considerable.

b) El costo de la reacción es considerablemente bajo, mientras que la reacción de Machado-Guerreiro necesita de un personal especializado y un equipo costoso, lo mismo ocurre en la reacción de Inmunofluorescencia.

c) La prueba utiliza fundamentalmente tres elementos químicamente desconocidos (**T. cruzi**). Suero problema y el Complemento), lo que le da ventajas sobre la reacción de Fijación del Complemento que tiene cinco elementos y por tanto más posibilidades de error.

d) Presenta una sensibilidad del 100% mientras que la reacción de Fijación del Complemento la posee entre 97 a 98%.

e) Permite hacer el diagnóstico en sueros parcialmente hemolisados.

f) Los sueros anticomplementarios, que resultarían de la reacción de Machado-Guerreiro, no tendrían ningún inconveniente en ser diagnosticados por la **reacción Anti-Crithidia**.

g) Hemos encontrado que el cultivo ideal para la realización de esta prueba, es el L.I.T. (liver-infusion-tryptose), por la capacidad de reproducción del **Trypanosoma cruzi** en este medio, y por la facilidad de utilizar el contenido total, por ser un medio monofásico.

Según los datos obtenidos y viendo las ventajas que ofrece esta prueba, sobre la Reacción de Fijación del Complemento (Machado-Guerreiro). Consideramos que esta prueba es de gran valor para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en su fase crónica.

RESUMEN

El autor presenta sus experiencias en el empleo de lo **Prueba del Dye test** o **Reacción Anti-Crithidia** para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas en su fase crónica. Hace la valoración de la prueba comparándola con la **Reacción de Fijación del Complemento** o **Reacción de Machado-Guerreiro** y realiza consideraciones sobre el valor y oportunidad de las diferentes pruebas serológicas preconizadas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en su fase crónica.

Practica la Reacción en 130 sueros los cuales los divide en 4 grupos:

Grupo I.— Siete sueros de pacientes con R.F.C. positivo y xenodiagnóstico positivo a *T. cruzi* con un 100 % de positividad para la **Reacción del Dye test**.

Grupo II.— 57 sueros de pacientes con R.F.C. positivo con un 100 % de positividad para la reacción en estudio.

Grupo III.— 60 sueros de personas con R.F.C. negativo con un 0 % de positividad para la **Reacción del Dye test**.

Grupo IV.— 6 sueros de pacientes con Leishmaniasis cutáneo-mucosa con un 0 % de positividad para la misma reacción.

Concluye considerando que la **Reacción del Dye test** es de gran valor para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en su fase crónica, basado en los resultados obtenidos en el presente trabajo

Trabajo realizado en el Laboratorio de la Cátedra de Parasitología del Departamento de Medicina Tropical y Microbiología de la Facultad de Medicina de La Universidad del Zulia.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — PIFANO, F. C. El diagnóstico Parasitológico de la Enfermedad de Chagas en su fase crónica. Estudio comparativo entre la gota gruesa, el xenodiagnóstico, el hemocultivo y las inoculaciones experimentales en animales sensibles. Arch. Ven. de Pat. Trop. y Para. Médica. II: 2, 121-146, 1954.
- 2 — MAZZA, S. Métodos diagnósticos de la enfermedad de Chagas; valor y oportunidad de cada uno de ellos. Separata de Actas y Trabajos del VI Congreso Nacional de Medicina. Córdoba. Tomo III, 7 págs. 1939.
- 3 — DIAS, E. Le xénodiagnostic appliqué a la Trypanosomiase Américaine. Ext. Comp. Rend. Soc. de Biol. Tomo CXVIII pp. 287, Agosto 1934. Rio de Janeiro.
- 4 — RAMACCIOTTI, F. CRISCOULO, E., CORTES, T., PAOLASSO, R., y ROCCA, J. Investigación de Schizotrypanum cruzi por la técnica de Martin-Leboeuf-Roubaud. 1ª Conferencia Nacional de Enfermedad de Chagas. Ministerio de Asistencia Social y Salud Pública de la Nación. Argentina pp. 117-118. 1953.
- 5 — DIAZ U., C. GALLARDO, Z. M., y YEPEZ, S. Uso de la prueba del Chipó en las investigaciones sobre el Trypanosoma cruzi. Rev. Iber. Para. Vol. 26 (2): 193-201. 1966.
- 6 — PEDREIRA DE FREITAS, J. L. Contribuicao para o estudo do diagnostico da molestia de Chagas por processos de laboratorio. Tese. Fac. Med. Univ. Sao Paulo. 1947.
- 7 — CHIARI, E y BRENER, Z. Contribuicao ao diagnostico parasitologico da doenca de Chagas na sua fase cronica. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 8 (3): 134-138. Maio-Junho 1966.
- 8 — MANSO, S. LORETTI, G. A. y RISPOLI, J. A. Cultivo de Trypanosoma cruzi en embrión de pollo. Primera Conferencia Nacional de la Enfermedad de Chagas. Ministerio de Asistencia Social y Salud Pública de la Nación. Argentina. pp. 145-146. 1953.
- 9 — BRUMPT, H. Le xénodiagnostic. Application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier a la trypanosomose de Chagas. Bull. Soc. Path. Exot. VII: 10 pp. 706-710. 1914.
- 10 — BENAÏM P. H. y DRAYER, B. A. Contribución al estudio etiológico de la miocarditis crónica en Venezuela: I Valoración de la enfermedad de Chagas como agente de cardiopatías crónicas. Arch. Ven. Pat. Trop. Para. Med. Vol. I (2): 94-129, Octubre 1949.
- 11 — GUERRERO, L., GUZMAN, G. M. y DOMINGUEZ, Q. M. Campaña contra la enfermedad de Chagas. Kasmira, Vol. 2 (1): 47-97, 1965.

- 12 — JIMENEZ, J. J. Informe sobre la campaña contra la Enfermedad de Chagas en el Estado Lara, llevada a cabo por el Servicio de Endemias Rurales de la Zona VI. Min. San. Asist. Soc. Dir. de Mal. San. Amb. División de Endemias Rurales, 1964.
- 13 — MAECKELT, G. A. Un procedimiento modificado de Xenodiagnóstico para la enfermedad de Chagas. Arch. Ven. de Med. Trop. y Para. Médica. Vol. IV, (2): 277-287, 1962.
- 14 — MAZZA, S. Primer quinquenio de la investigación por la M.E.P.R.A. de la enfermedad de Chagas en la provincia de Mendoza. M.E.P.R.A. Univ. de Buenos Aires, 1941.
- 15 — PONS, A. R. Algo más sobre la dolencia de Chagas en Venezuela. S.E.M. III (24-27) pp. 6-38, 1936.
- 16 — SOTO, U. R. y T. DE SOTO, S. Valor del Xenodiagnóstico en la fase crónica de la enfermedad de Chagas. Rev. Fac. Med. (Maracaibo) Vol. I N° 1 pp. 23-30, 1968.
- 17 — TORREALBA, J. F. Otros pequeños apuntes de la peste de Chagas en el Distrito Zaraza (Edo. Guárico). Reimp. de la Gac. Med. Caracas, 3 y 4 febrero 1939.
- 18 — SOTO, U. R. El Xenodiagnóstico. Experiencia personal en 100 casos de enfermedad de Chagas crónica. Kasmera, Vol. 3 N° 3 p.p. 167-225, 1970.
- 19 — GUERREIRO, C. y MACHADO, A. Da reacao de Bordet e Gengou na molesta de Carlos Chagas como elemento diagnostico. Brasil. Med. 27 (23): 225-226, 1913.
- 20 — MUNIZ, J. Do valor da reacao de precepitina no diagnostico das formas agudas e subagudas da doenca de Chagas (Trypanosomiasis americana). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 45 (3): 537-549, 1947.
- 21 — MONTANO, C. y UCROS, H. Comparación entre las Reacciones de Hemaglutinación y Fijación del Complemento en el diagnóstico Serológico de la Enfermedad de Chagas. Bol. Chile. Parasit. Vol. 20 (3): 62-67, 1965.
- 22 — PACKCHANIAN, A. Agglutination and precipitation tests for the diagnosis of *Trypanosoma cruzi* (Chagas'disease). J. Immunol., 29 (1): 84-85, 1935.
- 23 — MUNIZ, J. On the value of "Conditioned hemolysis" for the diagnosis of American trypanosomiasis. Hospital, 38 (5): 685-691, 1950.
- 24 — NUSSENZWEIG, V. y FARIA, R. Prova da antiglobulina no diagnostico da doenca de Chagas na fase cronica. Hospital, 47 (6): 81-92, 1955.
- 25 — MUNIZ, J. y SANTOS, M.C.F. Heterophile antibodies in American Trypanosomiasis. The presence of heterogenetic components in the antigenic structure of the *Schizotrypanum cruzi*

- shown by "conditioned hemolysis" reaction. Hospital, 38: 601-616. 1950.
- 26 — SADUN, E. H., DUXBURY, R. E., WILLIAMS, J. S. y ANDERSON, R. I. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of African and American trypanosomiasis in man. J. Parasitol. 49 (3): 385-388. 1963.
- 27 — CAMARGO, M. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 8 (5): 227-234. 1966.
- 28 — ARAUJO, F. G. y BATISTA, S. M. Observacoes sobre os testes de fixacao do complemento e imunofluorescencia indirecta en doenca de Chagas. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 11 (2): 104-110. 1969.
- 29 — LOUREIRO DE SOUZA, S. y CAMARGO M. E. The use of filter paper blood smears in a practical fluorescent test for American Trypanosomiasis serodiagnosis. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 8 (6): 255-258. 1966.
- 30 — SCORZA, J. V., ALVAREZ, A., RAMOS, I., DAGERT, C., VASQUEZ, A. D. y TORREALBA, J. F. Nuevo método rápido para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en su fase crónica. (Aplicación del "Dye test" de Sabin y Feldman). Arch. Venez. Med. Trop. y Para. Med. Vol. III (1): 121-135. 1959.
- 31 — SABIN, A. B. y FELDMAN, H. A. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). Science. 108: 660-663, 1948.
- 32 — BARRETO, P. M. Comunicación verbal.
- 33 — YAEGER, R. Comunicación verbal.
- 34 — MAECKELT, G. A. Fracciones antigénicas del *Schizotrypanum cruzi* como fijador del complemento. Arch. Venez. Med. Trop. y Para. Médica. Vol. IV. Nº 2 pp. 212-242. 1962.
- 35 — FIFE, H. R. y KENT, J. F. Protein and carbohydrate complement fixing Antigens of *Trypanosoma cruzi*. Am. J. Trop. Med., Vol 9 (5): 512-517. 1960.
- 36 — MAECKELT G.A. y DIAZ, V. A. La especificidad del antígeno de *Schizotrypanum cruzi*, fijador del complemento, frente a la infección por el *Trypanosoma rangeli*. Bol. Inf. Dir. Mal. San. Amb. Min. San. Asis. Soc. Vol III, Nº 5, pp. 245-252. 1963.
- 37 — PEDREIRA DE FREITAS, J. L. Referido por Pessoa, S.B. Parasitología Médica VI edición, Livraria editora Guanabara, Koogan S. A. Rio de Janeiro, 1963.
- 38 — OLIVEIRA DE ALMEIDA, J. Serological behaviour of lepro-ratous serum in relation to complement fixation test for Syphi-

- lis, Chagas Disease and Brucellosis. Rev. Bral. de Leprologia, Vol 32 (1-4): 15-22. 1964.
- 39 — ALVES DE LIMA, L. M., BARROS, C. A. y LIMA, A. J. M. Estudio realizado em doadores de sangue, com respeito a reacao de fixacao do complemento para doenca de Chagas. Rev. Fac. Med. Univ. Fed. Ceará Vol. 7 (1): 3-13. 1967.
- 40 — JACOMO R. Doenca de Chagas em Uberaba. Rev. Soc. Med. e Cir. de Uberaba. 1:29. 1950.
- 41 — MORA, R. M., ARAPE, I. C. y MAEKELT, G. A. Estudio sobre la incidencia de la infección chagásica entre los donantes de sangre de la Fuerzas Armadas de Venezuela. Arch. Venez. Med. Trop. y Para. Médica. Vol. III (2): 125-131. 1960.
- 42 — FREITAS, J. L. P., BIANCALANA, A., NETO, V. A., NUSSENZWEIG, V., SONNTAG, R. y BARRETO, J. G. Molestia de Chagas em banos de sangue na Capital de Sao Paulo. Hospital. (Rio) 41: 229-236. 1952.
- 43 — MAEKELT, G. A. Contribución para el estudio de la enfermedad de Chagas en Venezuela. Investigaciones serológicas de la enfermedad de Chagas mediante la reacción de fijación del complemento. Arch. Ven. Med. Trop. y Para. Médica. Vol. III. Nº 1 pp. 253-271. 1959.
- 44 — DURVAL, T. DE L. Epidemiologia da Doenca de Chagas em Pernambuco IV A reacao de Guerreiro-Machado na determinacao do nivel endemico. Rev. Bral. Mal. e Doencas. Trop. Vol. XI (4): 715-720. 1959.
- 45 — MORA, R. M. Estudio epidemiológico sobre la infección chagásica en miembros de las Fuerzas Armadas de Venezuela. Aspecto Serológico. Rev. Venez. San. Asist. Soc. 29: 457-464. 1964.
- 46 — CORNEJO, D., BERROIAL, A. y COBAS, N.E.A. A doenca de Chagas em Lima, Perú. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 11 (5): 610-612. 1962.
- 47 — PINTO, D. J. C. Prevalencia da doenca de Chagas entre crianças da zona rural de Bambuí, Machado-Guerreiro, apos ensaio profilatico. Rev. Bral. de Mal. e Doencas. Trop. Vol. XIX (2): 135-159. 1967.
- 48 — CORREDOR, A. A., CASTILLO, N., GUERRERO, P. G. y GIRALDO, M. O. Estudio serológico sobre incidencia de la infección Chagásica en los donantes de sangre del Hospital San Juan de Dios. 1er. Congreso Colombiano de Parasitología y 2º de Med. Trop. Medellín. Abril 12-14 de 1965.
- 49 — KNIERI, F. Resultados obtenidos con la Reacción de Fijación del Complemento según el 50% de hemólisis en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Bol. Chileno de Parasit. Vol. 14 (1): 5-6. 1969.

- 50 — NÚÑEZ, M. F., ARTEAGA, F. R. y MONTILLA, P. L. G. Estudio sobre la incidencia chagásica en donantes del Banco de Sangre del Estado Zulia. *Kasmera*. Vol. 3 (2): 159-165. 1969.
- 51 — PELLEGRINO, J. Técnica para a reacáo de precipitina no diagnóstico da doença de Chagas com sangue colhido no polpa digital. *Hospital* Vol. 43. (4): 37-41. 1953.
- 52 — MUNIZ, J. FREITAS, G. Contribucao o diagnostico da doença de Chagas pelas reacoes de imunidade. I, Estudo comparativo entre as reacoes de aglutinacao e de fixacao do complemento. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 41 (2): 303-333. 1944.
- 53 — MUNIZ, J. y FREITAS, G. Estudos sobre a imidade humoral da doença de Chagas. *Brasil Med.* 60 (42-43): 337-341. 1946.
- 54 — HAUSCHKA, T. S. Immunological relationship between 7 strains of *Trypanosoma cruzi* and its application in diagnosis of Chagas'disease. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 30 (1): 1-16. 1950.
- 55 — GOBLE, F. C. Observations on experimental Chagas'disease in dogs. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* (2): 189-204. 1952.
- 56 — MUNIZ, J. Conditioned hemolysis as a phenomenon of a more general-character, 5º Congreso Internacional de Microbiologia, Rio de Janeiro. Abstracts of Papers. (8) 144. 1950.
- 57 — ALMEIDA, J. O. y AZEVEDO, M. P. Estudos sobre hemolise condicionada. I. Relacoes quantitativas entre os elementos da reacáo de hemolise condicionada no sistema tuberculose. *Rev. Brasil. Biol.* 2 (2): 129-150. 1952.
- 58 — HENDERSON-BEGG, A. Heterophile antibodies in Trypanosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 40: 331-339. 1946.
- 59 — GOES, P. Estudos sobre a Inunidade cruzada. Tese. Fac. Nac. Farm. Univ. Brasil. 352 pp.
- 60 — GOES, P. Y. LOBO, M. B. Sobre o comportamento do anticorpo heterologo corrente da doença de Chagas. *Arq. Bras. Med.* 40: 307-318. 1950.
- 61 — JACOBS, L. y LUNDE, M. N. An hemagglutination test for toxoplasmosis. *J. Parasit.* 43: 308-314. 1957.
- 62 — KAGAN, I. C. Hemagglutination Test with *Ascaris* Antigens, *J. Immun.* 80: 396-399. 1957.
- 63 — KAGAN, I. G. y OLIVER-GONZALEZ, J. Hemagglutination Studies with Schistosome Antigens. *J. Parasit.* 44: 457-460. 1958.
- 64 — KNIERIN, F. y NIEDMANN, G. La reacción de hemaglutinación aplicada al diagnóstico serológico de la Hidatidosis. *Bol. Chile. Parasit* 16: 6-9. 1961.

- 65 — CERISOLA, J. FATALA CHABEN, M. y LAZZARI, J. Test de hemaglutinación para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Prensa Med. Argentina. 49: 1761-1767. 1962.
- 66 — CERISOLA, J. A., ALVAREZ M., LUGONES, H. y REBOSOLAN, J. B. Sensibilidad de las reacciones serológicas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Bol. Chile Parasit. 24 (1-2): 2-8. 1959.
- 67 — COONS, A. H., CREECH, H. J. y JONES, R. N. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 47: 200. 1941.
- 68 — FIFE, E. H. y MUSCHEL, L. H. Fluorescent antibody technique por serodiagnosis of Trypanosoma Cruzi infection. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 101: 540-543. 1959.
- 69 — VOLLER, A. Immunoflorescent observation on Trypanosoma cruzi. Trans. Soc. Trop. Med. Hyg. 57: 232. 1963.
- 70 — BIAGI, F., TAY, J. y MURRAY, R. M. La reacción de inmunofluorescencia en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Bol. Ofic. Sanit. Panam. 57: 234-240. 1964.
- 71 — CORREDOR, A. A., Giraldo, C.L.F. y Gaitán, C. A. Estudio comparativo de dos técnicas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Rev. Fac. de Med. (Bogotá-Colombia) Vol. 33 (5): 79-81. 1965.
- 72 — TOUSSAINT, A. J., TARRANT, C. y ANDERSON, R. I. Soluble antigen fluorescent antibody (S.A.F.A.) Test for the serorecognition of infection with Trypanosoma cruzi. J. Parasitology Vol. 51 (2) Suplemento. 1965.
- 73 — ALVAREZ, M., CERISOLA, J. A. y ROHWEDDER, R. W. Test de inmunofluorescencia para diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Bol. Chile. Parasitología. Vol. 23 (1-2); 4-9. 1968.
- 74 — MUNIZ, J. y BORIELLO, A. Estudio sobre a accao litica de diferentes soros sobre as formas de cultura e sanguicolas de "Schizotrypanum cruzi" Rev. Brasil. Biol. 5 (4): 563-576. 1945.
- 75 — SILVA, I. I. Acerca de la acción tripanolítica de las sangres sobre los cultivos de Trypanosoma cruzi y observaciones sobre el desarrollo del mismo en un nuevo medio de cultivo. Inst. Med. Reg. Publ. N° 706, Monografía N° 3. pp. 1-70 1956.
- 76 — RUBIO, M. Actividad litica de sueros normales sobre formas de cultivo y sanguíneas de Trypanosoma cruzi. Bol. Chileno Parasitol. Vol. XI (4): 62-69. 1956.
- 77 — AMATO, NEDO, V. Comentarios sobre o comportamento da reaccao de Sabín-Feldman em relacao ao diagnostico e controle de cura da toxoplasmose. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. Vol. I (5): 231-241. 1968.