

COMPARACION DE DOS METODOS DE DIAGNOSTICO DE LA INFECCION CRONICA POR TRYPANOSOMA CRUZI

*Reyes Alirio Torres **

*Magleny Leal ***

*Mireya Ocando ***

RESUMEN

Con la finalidad de seleccionar un método sensible para el diagnóstico parasitológico de la infección crónica por *Trypanosoma cruzi*, se comparó la eficacia del hemocultivo y de la inoculación intraperitoneal de ratones jóvenes. Ratones blancos (*Mus musculus*) de 21 días de edad fueron experimentalmente infectados con las cepas IgF y Zuliana de *Trypanosoma cruzi*. Cuando los animales alcanzaron la fase crónica, se obtuvieron muestras de sangre por punción cardíaca y 4 gotas de sangre fueron sembradas en cada uno de los tubos que contenía el medio difásico (NNN modificado) y 0.2 ml de sangre eran inoculados intraperitonealmente a ratones sanos. Los tubos fueron mantenidos en estufa a 25°C y tanto los medios de cultivo como los ratones inoculados fueron examinados a los 7, 15, 21, 30 y 45 días. Para ambas cepas el rendimiento del hemocultivo fue de 93.3% mientras que la positiv-

* Profesor Asociado Univer. del Zulia. Cátedra de Parasitología.
Escuela de Medicina. Facultad de Medicina

** Lics. Bioanálisis

dad de la inoculación de ratones fue de 53.3% para la cepa IgF y de 46% para la cepa Zuliana. Se obtuvieron altos porcentajes de falsos negativos con la inoculación de ratones; a tal punto que 4 ratones infectados con la cepa IgF y 6 con la cepa Zuliana fueron negativos mediante la inoculación pero resultaron positivos con el hemocultivo. Los resultados obtenidos nos hacen pensar que el futuro del diagnóstico parasitológico de la infección crónica por *Trypanosoma cruzi* está en el hemocultivo, sobre el cual se debe continuar investigando hasta obtener el medio ideal. Mientras tanto, sugerimos el uso del medio difásico (NNN modificado) en la rutina diagnóstica de nuestro laboratorio, inclusive para las infecciones humanas.

PALABRAS CLAVES:

Trypanosoma cruzi, diagnóstico parasitológico, Hemocultivo, Inoculación.

ABSTRACT

In order to choose a sensitive method for the parasitological diagnosis of chronic *Trypanosoma cruzi* infections, the efficiency of hemoculture and peritoneal inoculation of young mice was compared. White mice (*Mus musculus*) aged 21 days were experimentally infected with the IgF and Zuliana *Trypanosoma cruzi* strains. Blood samples were taken by cardiac puncture when the animals reached the chronic phase of the infection and 4 drops of blood were seeded into each tube containing diphasic medium (modified NNN medium) and 0.2 ml of blood were inoculated into the peritoneum of weanling mice. Seeded tubes were kept at 25°C. Both, tubes containing culture media and inoculated mice were examined on days 7, 15, 21, 30 and 45. Hemoculture efficiency was 93.3% for both strains, whilst positivity of 53.3% for IgF strain and 46% for Zuliana strain were obtained by mouse inoculation. High percentages of false negative results were obtained by mouse inoculation. In fact, 4 mice infected with the IgF strain and 6 infected with the Zuliana strain were negative by mouse inoculation but positive by hemoculture. The observed results make us think that hemoculture is the

future of the parasitological diagnosis of chronic *Trypanosoma cruzi* infections. More research must be done until getting an ideal medium; in the meantime, we suggest the diphasic medium (modified NNN medium) for routine diagnosis at our laboratory, including human infections.

KEY WORDS:

Trypanosoma cruzi, Parasitological diagnosis, Blood culture, inoculation.

INTRODUCCION

Trypanosoma cruzi Chagas, 1909, es un protozooario flagelado, agente causal en los vertebrados de la enfermedad de Chagas.

El diagnóstico parasitológico de la enfermedad de Chagas durante la fase aguda se realiza mediante métodos directos tales como: examen de sangre al fresco, frotis, gota gruesa y biopsia de tejidos. Esto se debe al elevado número de parásitos que se observan durante esta fase,

Durante la fase crónica, el diagnóstico parasitológico es muy difícil debido a la baja parasitemia que presenta el huésped vertebrado, esto descarta la posibilidad del diagnóstico por métodos directos; por ello son necesarios los métodos indirectos, que permitan la multiplicación del parásito, tales como el xenodiagnóstico, la inoculación de animales de experimentación y el hemocultivo.

A pesar de su baja sensibilidad, el xenodiagnóstico, introducido por Brumpt en 1914 (2), ha sido el método indirecto más empleado para el diagnóstico parasitológico de la infección chagásica crónica (7, 12).

La inoculación de animales de experimentación con sangre supuestamente infectada, ya sea por vía intraperitoneal (4) o por vía intracerebral (8, 14), no ha producido resultados satisfactorios, a pesar de que varios animales de laboratorio (conejos, ratas, ratones, cobayos, etc.) son sensibles a la infección por *Trypanosoma cruzi* (7, 13).

Los porcentajes de positividad obtenidos con el hemocultivo han sido muy variados a pesar de que *Trypanosoma cruzi* crece bien en los diferentes medios de cultivo: Albuquerque y cols. (1) 97.4% Chiari y Brenner (5) 25.7%, Minter-Goedbloed (9) 27%, Mourao y Mello (10) 45%, Chiari y Díaz (6) 43.7% y Freitas (7) 0%.

Martínez Silva y cols. (8) estudiaron 30 ratones con infección Chagásica crónica utilizando tres métodos de diagnóstico (hemocultivo, inoculación intracerebral de ratones recién nacidos y cultivo celular). El cultivo de tejidos fue positivo en el 100% de los casos, mientras que la positividad se restringió a 93.3% tanto para el hemocultivo como para la inoculación intracerebral.

Caldera y Rubio (3) emplearon tres medios de cultivo (Warren, caldo cerebro corazón y difásico) para el diagnóstico de la infección aguda experimental por *Trypanosoma cruzi* y obtuvieron mejores resultados con el medio difásico tanto para el aislamiento primario como para el mantenimiento de las cepas. En base a los buenos resultados obtenidos por estos autores, nos dedicamos al estudio de la posible utilidad del medio difásico para el diagnóstico de las infecciones crónicas.

MATERIAL Y METODO

1. Cepas de *Trypanosoma cruzi*.

- Cepa IgF: aislada de un paciente con infección chagásica crónica en Sao Paulo - Brasil.
- Cepa Zuliana: aislada a partir del contenido intestinal de triatomo naturalmente infectado en Maracaibo - Venezuela.

2. Ratones.

Se utilizaron ratones blancos (*Mus musculus*) de 21 días de edad del mismo peso y el mismo sexo, criados en el bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia.

3. Medio de cultivo.

Medio difásico (NNN modificado) (3):

- Preparar una solución que contenga 37 gr. de caldo cerebro corazón 20 gr. de agar y 100 ml. de agua destilada.

— Hervir y luego esterilizar en autoclave a 115°C durante 20 minutos.

— Agregar 400 ml. de sangre desfibrinada de carnero y luego repartir a razón de 5 ml. en cada tubo, inclinando el mismo de manera que se forme un bisel.

— Agregar a cada tubo 3 ml. de caldo cerebro corazón estéril.

A partir de los cultivos de cada una de las cepas se preparó una suspensión con caldo cerebro corazón y 0.2 ml. de la misma fueron inoculados intraperitonealmente a los ratones (15 ratones por cada cepa).

Cuando los ratones alcanzaron la fase crónica de la infección (16 semanas después de la inoculación) fueron tomadas muestras de sangre para hemocultivo y para inocular los ratones de experimentación; la muestra se obtuvo mediante punción cardíaca y 4 gotas de sangre eran sembradas en cada tubo de medio cultivo y 0.2 ml. eran inoculados intraperitonealmente a ratones sanos. Los tubos fueron mantenidos en estufa a 25°C y tanto los medios como los ratones fueron examinados a los 7, 15, 21, 30 y 45 días de haber sido sembrados o inoculados respectivamente.

Para el análisis de los resultados se utilizaron las pruebas de χ^2 y de McNemar.

RESULTADOS

El cuadro No. 1 muestra la comparación de dos métodos para el diagnóstico de la infección crónica por la cepa IgF de *Trypanosoma cruzi*. De los 15 hemocultivos practicados, 14 (93.3%) resultaron positivos, mientras que la positividad de la inoculación de ratones fue de 53.3% $\chi^2 = 6.4$.

En el cuadro 2 se hace la misma comparación, pero ahora para la cepa Zuliana. 14 hemocultivos resultaron positivos (93.3%) mientras que la positividad fue de apenas 46.6% para la inoculación. $\chi^2 = 7.3$.

El cuadro 3 representa la sensibilidad y especificidad de ambos mé-

todos para el diagnóstico de las infecciones por la cepa IgF. 8 animales resultaron positivos tanto para el hemocultivo como por inoculación, uno fue negativo por ambos métodos y 4 animales negativos por inoculación de ratones resultaron positivos por hemocultivo. A estos datos se aplicó la prueba de McNemar con los siguientes resultados: $\chi^2 = 4$; porcentaje de concordancia = 63.23; porcentaje de discordancia = 30.77; probabilidad de la inoculación ser positiva y el hemocultivo negativo = 0%; probabilidad de la inoculación ser negativa y el hemocultivo positivo = 30.77%

CUADRO No. 1

Comparación de dos métodos para el diagnóstico de la infección crónica por *Trypanosoma cruzi* Cepa IgF

METODO DIAGNOSTICO	NUMERO EXAMINADO	POSITIVOS	PORCENTAJE DE POSITIVOS
HEMOCULTIVO	15	14	93.3
INOCULACION DE RATON	15	8	53.3

$$\chi^2 = 6.4$$

CUADRO No. 2

Comparación de dos métodos para el diagnóstico de la infección crónica experimental por *Trypanosoma cruzi* Cepa Zuliana.

METODO DIAGNOSTICO	NUMERO EXAMINADO	POSITIVOS	PORCENTAJE DE POSITIVOS
HEMOCULTIVO	15	14	93.3
INOCULACION DE RATON	15	7	46.6

$$\chi^2 = 7.3$$

El cuadro 4 muestra la sensibilidad y especificidad de los métodos en las infecciones por la cepa Zuliana. 7 ratones fueron positivos y uno negativo por ambos métodos y 6 animales negativos por la inoculación

CUADRO No. 3

Sensibilidad y especificidad de dos métodos para el diagnóstico de la infección crónica por *Trypanosoma cruzi* Cepa IgF

INOCULACION DE RATON / HEMOCULTIVO	POSITIVOS	NEGATIVOS
POSITIVOS	8	4
NEGATIVOS	0	1

$$X^2 = 6$$

CUADRO No.4

Sensibilidad y especificidad de dos métodos para el diagnóstico de la infección crónica por *Trypanosoma cruzi* Cepa Zuliana

INOCULACION DE RATON / HEMOCULTIVO	POSITIVOS	NEGATIVOS
POSITIVOS	7	6
NEGATIVOS	0	1

$$X^2 = 6$$

resultaron positivos con el hemocultivo. La prueba de McNemar arrojó los siguientes resultados: $X^2 = 6$; porcentaje de concordancia = 57.14; porcentaje de discordancia = 42.85; probabilidad de inoculación negativa y hemocultivo positivo = 42.85%.

DISCUSION

El hemocultivo es un método parasitológico indirecto utilizado para detectar la infección del huésped vertebrado por *Trypanosoma cruzi*; su rendimiento como método diagnóstico depende de varios factores:

Según Pifano (11), la densidad parasitaria y el potencial macrofágico son factores que condicionan el aislamiento de *Trypanosoma cruzi*. Mourao y Mello (10) opinan que la sensibilidad depende del número de hemocultivos realizados. Según Chiari y Brener (5), la sensibilidad del método depende de la naturaleza del medio empleado y de la técnica de preparación del inóculo.

Los resultados obtenidos por los diferentes autores han sido muy variados y poco satisfactorios cuando el hemocultivo se emplea con fines diagnósticos en infecciones humanas crónicas:

Freitas (7) obtuvo resultados negativos con el medio NNN al practicar 37 hemocultivos a 21 chagásicos crónicos. Albuquerque y cols. (1) aislaron tripanosomas en 37 (97.4%) de 38 chagásicos crónicos utilizando el medio de Warren; sin embargo, este resultado no ha podido ser reproducido por otros autores. Pifano (12) practicó simultáneamente xenodiagnóstico y hemocultivo a 35 pacientes y reporta positivities de 91% y 14% respectivamente.

En el presente estudio el hemocultivo con el medio difásico (NNN modificado) arrojó mejores resultados que la inoculación intraperitoneal de ratones, tanto para la cepa IgF como para la cepa Zuliana; a tal punto que 4 ratones infectados con la cepa IgF resultaron negativos por la inoculación mientras que fueron positivos por el hemocultivo y lo mismo ocurrió con 6 ratones infectados con la cepa Zuliana. La sensibilidad

del hemocultivo fue superior al 90% mejor que la sensibilidad reportada en la literatura para el xenodiagnóstico, el cual es el método parasitológico indirecto más utilizado en el diagnóstico de la infección chagásica durante la fase crónica.

El buen rendimiento observado en este trabajo nos hace pensar que el futuro del diagnóstico parasitológico de la infección crónica por *Trypanosoma cruzi* está en el hemocultivo, sobre el cual se debe seguir trabajando hasta obtener el medio ideal. Mientras tanto, sugerimos utilizar el medio difásico (NNN modificado) en la rutina diagnóstica de nuestro laboratorio, inclusive para las infecciones humanas.

CONCLUSIONES

— Se obtuvieron altos porcentajes de positividad con el hemocultivo, porcentaje muy superior a los observados con la inoculación intraperitoneal de ratones.

— Se deben continuar las investigaciones sobre el hemocultivo con la finalidad de producir un medio ideal para el diagnóstico de la infección crónica por *Trypanosoma cruzi*; mientras tanto, se recomienda el uso del medio difásico (NNN modificado).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ALBUQUERQUE, R. D. R.; FERNANDEZ, L. A. R.; FUNAYAMA, G. K.; FERRIOLI FILHO, F.; SIQUEIRA, A. F.: Hemoculturas seriadas com o meio de Warren em pacientes com reacao de Guerreiro Machado positiva. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, 14: 1-5, 1972.

2. BRUMPT, E.: O xenodiagnóstico. Aplicacao ao diagnóstico de algumas infeccoes parasitarias e em particular á tripanosomose de Chagas. Anais Paulistas de Medicina e Cirurgia, 3: 97-102, 1914.

3. CALDERA, Y.; RUBIO, D.: Dinámica de crecimiento de cuatro cepas de *Trypanosoma cruzi* en tres medios de cultivo. Tesis de Grado, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, 1987.

4. CHAGAS, C.: Nova tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n. gen.; n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1:159-218, 1909.

5. CHIARI, E.; BRENER, Z.: Contribuicao ao diagnóstico parasitológico da doença de Chagas na sua fase cronica. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 8:134-8, 1966.

6. CHIARI, E.; DIAS, J. C. P.: Nota sobre uma nova técnica de hemocultura para o diagnóstico parasitológico na doença de Chagas na sua fase cronica. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 9: 133-6. 1975.

7. FREITAS, J. L. P.: Contribuicao para estudo do diagnóstico da molestia de Chagas por processos de laboratorio. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, 1947.

8. MARTINEZ SILVA, R.; LOPEZ, V. A.; COLON, J. I.; CHIRIBOGA, J.: Isolation of *Trypanosoma cruzi* from blood of acutely and chronically infected mice in tissue culture. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 18:878-84, 1969.

9. MINTER GOELDBLOED, E.: Hemoculture compared with xenodiagnosis for the detection of *T. cruzi* infection in man and animals. In: *New Approaches in American Trypanosomiasis Research. Proceedings of an International Symposium (Belo Horizonte, 1975)*, Sc. Publ. No. 318, Washington: 245-52, 1976.

10. MOURAO, O. G.; Mello, O. C.: Hemoculturas para o diagnóstico parasitológico na fase cronica da doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 9: 183-8, 1975.

11. PIFANO, F. C.: El diagnóstico parasitológico de la enfermedad de Chagas en fase crónica. Estudio comparativo entre la gota gruesa, el xenodiagnóstico, el hemocultivo y las inoculaciones experimentales en animales sensibles. *Archivos Venezolanos de Patología Tropical y Parasitología Médica*, 2:89-120, 1954.

12. PIFANO, F. C.: Evaluación de los procedimientos de laboratorio empleados en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, 49:563-71, 1960.

13. SALGADO, A. A.: Consideraciones sobre metodología y sensibilidad de xenodiagnóstico. *Boletín de Parasitología*, 24:9-13, 1969.

14. SANABRIA, A.: Ultrastructure of *Trypanosoma cruzi* in mouse brain. *Experimental Parasitology*, 23:379-91, 1968.