

EVALUACION DE LOS PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO EMPLEADOS EN EL DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS*

DR. FELIX PIFANO C.

Profesor de Medicina Tropical de la Universidad Central de Venezuela

El diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas puede establecerse por dos procedimientos:

1) Comprobando la presencia del *Schizotrypanum cruzi* en el organismo humano: Diagnóstico parasitológico, o

2) Demostrando la existencia de fenómenos inmunológicos resultantes del complejo reaccional huésped-parásito: Diagnóstico serológico.

Para la correcta evaluación de los métodos de laboratorio empleados en el diagnóstico de esta enfermedad, es necesario fijar un criterio acerca de la evolución clínica de la dolencia en relación con la dinámica parasitológica de la infección. Desde el punto de vista clínico, la enfermedad de Chagas puede ser observada en dos fases: una aguda y otra crónica. La fase aguda se caracteriza por un proceso febril, acompañado en ocasiones de síntomas locales dependientes del sitio de penetración del *Schizotrypanum cruzi* en el organismo humano (chagoma de inoculación, complejo oftalmoganglionar) y por tripanosomas en la sangre periférica, la mayoría de las veces fácilmente evidenciables por métodos directos (examen de la sangre en fresco, gota gruesa). En esta fase de la enfermedad, se puede distinguir una forma benigna, de evolución favorable, y una forma grave, que presenta el cuadro de una miocarditis aguda o de una meningoencefalitis, de evolución generalmente mortales. En un determinado número de casos, la infección se produce sin que la persona presente ningún síntoma, y la tripanosomiasis adopta una forma latente desde el comienzo. La forma crónica se caracteriza por una curación apa-

rente de la infección, que sigue a la fase aguda (infección latente), o por la aparición, más o menos tardía, de manifestaciones cardiovasculares con las características de una miocarditis crónica (miocardiopatía crónica chagásica). La frecuencia del ataque miocárdico en la enfermedad de Chagas aumenta a medida que se aplican, en forma periódica y sistemática, métodos especiales de exploración cardiovascular durante la marcha crónica de la enfermedad, de manera que consideramos que todo caso de la enfermedad de Chagas es potencialmente un cardiópata. En la fase crónica de la dolencia, el *Schizotrypanum cruzi* es más bien un parásito de los tejidos (leishmania) que de la sangre (tripanosomas), y su comprobación en la sangre periférica sólo es posible en un número de casos inversamente proporcional a la antigüedad de la infección, mediante el xenodiagnóstico, hemocultivos o inoculaciones experimentales en animales sensibles. En estas circunstancias las pruebas inmunológicas dan mejores resultados que los procedimientos anteriores. Entre la fase aguda y la fase crónica de la enfermedad, hay un período de transición, de duración variable, en el cual se van extinguiendo gradualmente las manifestaciones de la fase aguda, observándose con frecuencia una pequeña elevación térmica de carácter irregular, y polimicroadenopatías generalizadas, con discreto ataque hepatoesplénico o sin él. En este período de la enfermedad se pueden encontrar ocasionalmente tripanosomas en la sangre periférica, que circulan en forma discontinua e irregular, y que llegan a desaparecer a medida que los casos evolucionan hacia la cronicidad.

La aparición de los primeros tripanosomas en la sangre periférica del hombre, una vez realizada la infección, tiene lugar en un lapso

* Trabajo presentado en la reunión del Grupo de Estudios sobre Enfermedad de Chagas, celebrada en Washington, D. C., del 7 al 11 de marzo de 1960.

variable generalmente entre 10 y 15 días, que constituye el período de incubación o período prepatente de la schizotrypanosis. Comienza entonces el período de parasitemia durante la cual los tripanosomas se mantienen en la sangre periférica de 30 a 45 días, en ocasiones más, y constituye el período patente de la parasitemia. Transcurrido este período, la fase de parasitemia se extingue progresivamente y los tripanosomas desaparecen de la circulación periférica, lo que constituye el período subpatente, durante el cual los trypanosomas pueden circular en la sangre periférica en forma discontinua, intermitente e irregular, siendo su número siempre pequeño y sólo demostrable por métodos indirectos (xenodiagnóstico, hemocultivos e inoculaciones experimentales en animales sensibles). En casos de evolución muy antigua, los parásitos no circulan en la sangre periférica, estableciéndose un equilibrio humoral huésped-parásito, con presencia de formas leishmanias de resistencia en los tejidos, especialmente el miocardio.

El *Schizotrypanum cruzi*, al actuar en los tejidos del huésped vertebrado, origina fenómenos inmunológicos con la formación, en concentraciones variables, de anticuerpos del grupo de las aglutininas, precipitinas y sensibilizadoras, que son utilizados en el diagnóstico serológico de la enfermedad.

A continuación se hace una síntesis de la evaluación de los procedimientos más comúnmente empleados en la práctica médica para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. En este sentido, solamente analizaremos los siguientes procedimientos de diagnóstico: 1) Exámen de la sangre en fresco y coloreada; 2) Xenodiagnóstico; 3) Inoculaciones experimentales en animales sensibles; 4) Hemocultivo, y 5) Reacciones serológicas.

EXAMEN DE LA SANGRE EN FRESCO Y COLOREADA

La comprobación del *Schizotrypanum cruzi* en la sangre periférica mediante el examen en fresco y por métodos de coloración, sólo es posible durante la fase aguda de la dolencia y en aquellos casos de infección

latente en que un examen de rutina permite descubrir los tripanosomas circulantes en la sangre periférica. Aun cuando haya suficiente base de sospecha clínica y epidemiológica, el examen puede ser negativo, porque en la mayoría de los casos la parasitemia es relativamente escasa y de duración breve, con tendencia a la disminución progresiva. Por otra parte, existen casos de enfermedad de Chagas muy pobres en manifestaciones clínicas y completamente asintomáticos, y sin embargo los tripanosomas pueden encontrarse en la sangre periférica. En tales casos, como existen tan pocos elementos que justifiquen sospecha clínica, el examen de sangre no se practica. Tomando en cuenta estos aspectos de la infección, consideramos que, en todo caso sospechoso de la enfermedad, en fase aguda o de latencia, debe hacerse un examen de la sangre periférica en fresco y mediante gota gruesa por los siguientes motivos: 1) porque puede tratarse de la fase aguda de la enfermedad en donde la parasitemia acompaña generalmente al cuadro clínico; 2) porque se puede estar en presencia de una fase aguda o subaguda de la enfermedad, en regresión en el momento del examen, pero en la cual puedan todavía comprobarse parásitos; 3) porque la infección puede ser latente desde el comienzo, sin síntomas, pero con tripanosomas en la sangre periférica; 4) porque pueden sorprenderse pequeñas descargas parasitarias en la circulación periférica en casos de larga evolución, no acompañadas generalmente de manifestaciones clínicas ostensibles.

El método de elección para investigar el *Schizotrypanum cruzi* en la sangre periférica es el de la gota gruesa. Nosotros practicamos, en cada caso, por lo menos 20 gotas gruesas y dedicamos una hora al examen de cada preparación. Siguiendo este método de examen, hemos comprobado tripanosomas en el 20 % de casos crónicos de evolución relativamente reciente, en los cuales la investigación había sido negativa por el examen de rutina de una sola gota gruesa. En algunos casos, sólo hemos llegado a comprobar un solo parásito después de prolongada bús-

queda. La gota gruesa, por el hecho de concentrar una cantidad relativamente grande en un pequeño espacio (generalmente de 1 a 1,5 cm. de diámetro) y de emplear por lo menos tres gotas de sangre para obtenerla, debe preferirse al examen en fresco y al extendido, en donde la cantidad de sangre utilizada es menor.

XENODIAGNOSTICO

El xenodiagnóstico constituye hasta el presente el mejor procedimiento para demostrar la presencia del *Schizotrypanum cruzi* en la sangre de pacientes que presentan la forma crónica de la enfermedad de Chagas. El método consiste en demostrar si los insectos transmisores de la dolencia, nacidos y criados en el laboratorio y por tanto indemnes de tripanosomas, se infectan al alimentarse en el hombre o en los animales que se suponen parasitados por el *Schizotrypanum cruzi*.

Para que el xenodiagnóstico sea positivo es necesario que los triatomidios de cría, además de la sangre, ingieran los tripanosomas que parasitan al huésped vertebrado. La posibilidad de que los tripanosomas sean más frecuentes en la circulación capilar y pre-capilar que en la periférica, lo cual facilitaría su captación por los reduvidios, no explica satisfactoriamente la positividad del xenodiagnóstico de casos con repetidos exámenes de sangre negativos por el método directo. La circunstancia de que en ocasiones permanezcan indemnes de infección tripanosomíasis ejemplares de lotes de reduvidios que fueron alimentados a un mismo tiempo en el hombre o en animales con elevada densidad hemoparasitaria de tripanosomas, lleva a la necesidad de considerar otros aspectos del problema. No deja de llamar la atención, sin embargo, la negatividad del examen prolijo de gotas gruesas en número elevado, del hemocultivo y de las inoculaciones experimentales en animales sensibles, en contraste con xenodiagnósticos positivos practicados en el mismo momento sobre la persona o animal sospechoso de ser portador del parásito. No sabemos si se requiere cierto grado de maduración de los tripanosomas para que

puedan continuar su desarrollo en el medio intestinal del triatomidio o si la constitución físico-química de este medio y la presencia de bacterias diversas, especialmente del grupo de las simbiota, establecen determinado equilibrio, no siempre constante, que permite dicha evolución. Es un hecho de observación frecuente por los que trabajan en gran escala en el xenodiagnóstico de casos crónicos de enfermedad de Chagas o en animales con infección latente en condiciones naturales o de laboratorio, que no siempre se infectan todos los triatomidios alimentados en el huésped vertebrado. Por otra parte, no es uniforme la positividad del xenodiagnóstico en series practicadas a un mismo enfermo o animal a intervalos regulares. Los factores que condicionan la positividad del xenodiagnóstico en los casos crónicos de la enfermedad de Chagas, es un asunto que requiere investigación.

Para la prueba del xenodiagnóstico es recomendable trabajar con crías de laboratorio de la especie de triatomidios considerada como transmisora más frecuente en la región investigada. Se ha podido comprobar que algunas especies de triatomidios tienen una receptividad variable a cepas de *Schizotrypanum cruzi* de diferente procedencia, y que el parásito se adapta mejor a la especie de insecto que lo transmite en la misma localidad. Por esta razón, en Venezuela debe emplearse en el xenodiagnóstico el *Rhodnius prolixus*, y hay que organizar crías en cada región en donde se trabaja con miras a utilizar la misma especie que allí transmite el agente etiológico. En la prueba xenodiagnóstica se emplea un mínimo de 12 ejemplares de triatomidios, preferentemente ninfas, que se alimentan en la persona sospechosa hasta saciarse. Siempre que sea posible, se hace que se alimenten dos veces más del mismo enfermo, a intervalos de dos semanas. Los que se alimentan una sola vez son alimentados dos semanas más tarde en cobayos sanos, evitando hacerlo en gallinas o palomas por la actividad tripanolítica del suero de estos animales. Se ha comprobado que la frecuencia de positividad del xenodiagnóstico aumenta con el número

de comidas de los insectos que participan en la prueba. La investigación de tripanosomas en el contenido intestinal de los triatomas, especialmente en la ampolla rectal, se lleva a cabo seis semanas después de la primera comida, aunque en ocasiones se disecan algunos ejemplares de la tercera a la cuarta semana, por haberse demostrado que, en casos positivos, es posible comprobar tripanosomas a partir de las dos semanas que siguen a la fecha de la primera comida. Debe colorearse sistemáticamente el material para diferenciar el *Schizotrypanum cruzi* del *Trypanosoma rangeli*.

Para la evaluación del xenodiagnóstico en el diagnóstico de las formas crónicas de la enfermedad de Chagas, se han seleccionado como ejemplo tres grupos de enfermos, que representan diferentes grados de avance en esta forma clínica de la dolencia:

1) Personas que vivieron desde su nacimiento en ranchos donde abundaba la población de triatomas infectados con *Schizotrypanum cruzi*. Este grupo comprende 80 personas de 1 a 10 años de edad, que en el momento del examen aún vivían en ranchos con triatomídeos infectados. Examen de sangre periférica (gotas gruesas) negativo a tripanosomas. El xenodiagnóstico en este grupo de personas ha sido positivo en el 75 % de los casos.

2) Personas con antecedentes de haber vivido de niños en ranchos, y que dicen conocer los triatomas y haber sido picados por ellos. En los últimos 10 años han abandonado el área endémica. Examen de sangre periférica negativo a tripanosomas. Este grupo comprende 180 personas en las cuales el xenodiagnóstico ha sido positivo en el 37,50 % de los casos.

3) Personas que hace 20 años o más abandonaron el área endémica. Examen de sangre periférica negativa a tripanosomas en el momento del examen. Este grupo comprende 60 casos con 16,66 % de positividad xenodiagnóstica.

Las investigaciones anteriores confirman la opinión de muchos autores según la cual, a medida que la enfermedad de Chagas se

hace crónica, la positividad del xenodiagnóstico es menos frecuente.

Los trabajos experimentales que hemos hecho con el objeto de estudiar el xenodiagnóstico en animales infectados con varias cepas venezolanas de *Schizotrypanum cruzi*, en comparación con el resultado del examen de sangre periférica mediante gotas gruesas e investigación de formas leishmanias en miocardio, aportan una serie de datos que es conveniente analizar. De un total de 124 xenodiagnósticos hechos cada cuatro semanas en una serie de acures con infección chagásica crónica, sólo fueron positivos 55 (44,35 %). De los 1.240 ejemplares de *R. prolixus* utilizados en las pruebas, solamente se infectaron 420 especímenes sobrevivientes de los 590 especímenes que correspondían a los xenodiagnósticos positivos. Si suponemos que los 590 especímenes de *R. prolixus* hubiesen sobrevivido con infección schizotrypanósica, resulta que solamente el 47,58 % se hubiera infectado con tripanosomas, lo que indica que un 52,42 % de los triatomídeos no captó los tripanosomas circulantes en los animales con infección latente. La falla del xenodiagnóstico en animales con infección segura nos indica que un 55,65 % se hubieran catalogado como indemnes de infección chagásica si no se hubiesen tomado en cuenta los datos relacionados con las inoculaciones, los xenodiagnósticos positivos en épocas diversas y la histología patológica positiva en miocardio a las formas de leishmanias de *Schizotrypanum cruzi* comprobadas en los animales con xenodiagnóstico negativos en las fases avanzadas de la tripanosomiasis. De un total de 29 xenodiagnósticos hechos cada cuatro semanas a una serie de cachorros de perro experimentalmente infectados con *Schizotrypanum cruzi*, 21 fueron positivos (72,75 %). Del total de 361 ejemplares de *R. prolixus* utilizados en las pruebas, sólo se infectaron 137 especímenes sobrevivientes de los 199 ejemplares que correspondían a los xenos positivos. Si suponemos que los 199 ejemplares de *R. prolixus* hubiesen sobrevivido con infección schizotrypanósica, resulta que sólo el 55,12 % se hubieran infec-

tado con tripanosomas, lo que indica que un 44,88% de los triatomidos no captó los tripanosomas circulantes en los animales con infección latente. Del total de xenos positivos se desprende que la infección chagásica dejó de ser diagnosticada en el 27,25% de los animales.

Desde 1936 a 1958 hemos hecho un total de 20.485 xenodiagnósticos (incluyendo encuestas epidemiológicas de campo y exámenes de rutina en casos sospechosos), empleando en las pruebas un total aproximado de 250.000 especímenes de *Rhodnius prolixus* criados en el laboratorio. En este material hemos comprobado hasta el presente un total de 1.600 casos de enfermedad de Chagas en la fase crónica (7,80%). Esta cifra no expresa el porcentaje real de la enfermedad de Chagas en el material, ya que, según nuestras investigaciones, un 40% de casos seguros de la dolencia dejan de ser comprobados por un solo xenodiagnóstico, mientras que repitiendo periódicamente el xeno y aumentando el número de comidas, el porcentaje de negatividad desciende al 20-30%.

No obstante lo expuesto anteriormente, consideramos el xenodiagnóstico como un procedimiento de extraordinaria utilidad, no sólo por el valor absoluto que representa la positividad del resultado, sino por la posibilidad de su aplicación en apartadas regiones en donde se carece de medios adecuados para aplicar técnicas especializadas en otros campos del diagnóstico. Por otra parte, la positividad del xenodiagnóstico indica la existencia de la enfermedad de Chagas en sentido dinámico, susceptible de ser mantenida desde el punto de vista interhumano por los triatomidos domiciliarios.

INOCULACIONES EXPERIMENTALES EN ANIMALES SENSIBLES

Para la evaluación del diagnóstico de las formas crónicas de la enfermedad de Chagas mediante las inoculaciones experimentales en animales sensibles, se utilizaron el cobayo y el cachorro de perro, por ser animales muy sensibles al *Schizotrypanum cruzi* en condiciones de laboratorio y por tolerar cantidades

relativamente apreciables de sangre por las vías subcutánea e intraperitoneal. Para este fin se seleccionaron 40 casos de enfermedad de Chagas en la fase crónica y se inoculó con sangre citratada de cada uno de ellos (1 c.c. de solución de citrato de sodio al 3,8% en suero fisiológico para 9 c.c. de sangre obtenida por punción venosa) a un cobayo de desarrollo completo y a un cachorro de perro de 4 a 6 semanas de edad. Estos animales fueron inoculados simultáneamente por las vías subcutánea (2 c.c.), intraperitoneal (5 c.c. para los cachorros de perro y 3 c.c. para los cobayos) y conjuntival (3 gotas de sangre aplicadas en el fondo de saco conjuntival). Sólo obtuvimos resultados positivos en el cachorro de perro en 5 casos (12,50%), habiendo permanecido negativos los cobayos inoculados. El cachorro de perro se mostró más sensible que el acure a las cepas venezolanas de *Schizotrypanum cruzi*, pero los resultados de las investigaciones demuestran que el procedimiento no es recomendable para el diagnóstico de rutina de las formas crónicas de la enfermedad de Chagas.

HEMOCULTIVO

Aunque el *Schizotrypanum cruzi* se desarrolla muy bien en medios con gelosa sangre (NNN, gelosa nutritiva glucosada, según Davis, Agar difásico según Von Brandt, Nöller, Senekjie y otros) y en medios con solución de Locke y sangre humana, el hemocultivo no constituye un método recomendable para el diagnóstico de rutina de las formas crónicas de la enfermedad de Chagas. La posibilidad de aislar el *Schizotrypanum cruzi* en las formas crónicas de la dolencia mediante el hemocultivo está condicionada a factores muy diversos y en parte complejos, representados principalmente por la densidad hemoparasitaria, potencial macrofágico de los leucocitos transportados y condiciones de los medios para satisfacer los requerimientos metabólicos iniciales de los parásitos sembrados.

De un total de 100 casos crónicos de la enfermedad de Chagas, que habían sido comprobados por el xenodiagnóstico con an-

terioridad, los hemocultivos fueron positivos a *Schizotrypanum cruzi* sólo en 16 de ellos (16%). De cada caso se sembraron 6 tubos de gelosa nutritiva glucosada según Davis con sangre desfibrinada de conejo, llevando a cada tubo 0,5 c.c. de sangre venosa citrada del paciente (1 c.c. de una solución de citrato de sodio al 3,8% en suero fisiológico, por 5 c.c. de sangre). De este grupo de enfermos se escogieron 35 en los cuales se practicó simultáneamente el xenodiagnóstico y el hemocultivo. El xenodiagnóstico fue positivo en 32 (91,42%) y el hemocultivo en 5 (14,28%). Como puede verse, los resultados obtenidos con el hemocultivo en la forma crónica de la enfermedad de Chagas están muy lejos de los suministrados por el xenodiagnóstico. En cambio, en la tripanosomiasis rangeli, el hemocultivo suministra resultados comparables o superiores al xenodiagnóstico.

REACCIONES SEROLOGICAS

Reacciones de aglutinación

La demostración de aglutininas en el suero de casos de enfermedad de Chagas, poniendo en contacto suspensiones de cultivos vivos de *Schizotrypanum cruzi* con diluciones progresivas de suero de pacientes, revela títulos inconstantes que restan a este procedimiento un valor práctico en el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas. Se han observado, por otra parte, aglutinaciones inespecíficas en sueros normales. Muniz y Freitas (1944) han podido comprobar que sometiendo estos sueros a la prueba de absorción con pulpa de riñón de cobayo, pierden completamente el poder aglutinante para el *Schizotrypanum cruzi*, lo que demuestra que el fenómeno es debido a un anticuerpo heterófilo de poder aglutinante que se encuentra en el suero de ciertos individuos libres de infección chagásica y a la presencia de un componente heterogénico en la estructura antigénica del parásito.

Reacción de precipitación

La investigación de precipitinas con la fracción de polisacáridos, aisladas de culti-

vos de *Schizotrypanum cruzi*, según el método de Fuller, fue propuesta por Muniz y Freitas, en 1944, para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas. Representa un elemento auxiliar del diagnóstico serológico de la dolencia en su fase inicial, coincidiendo la positividad de la reacción con la etapa de parasitemia. La reacción es por tanto positiva en las formas agudas de la enfermedad, pero en las formas crónicas carece de valor por ser, en general, la positividad inferior al 20%. En 36 casos agudos de enfermedad de Chagas estudiados por nosotros, la reacción de precipitación ha sido francamente positiva en 34 (94,44%). En cambio, en 52 casos crónicos la reacción ha sido positiva en 5 (9,61%).

Reacción de fijación del complemento

La demostración de anticuerpos de fijación en el suero de casos de enfermedad de Chagas, empleando como antígeno preparados de cultivos de *Schizotrypanum cruzi*, representa un procedimiento de valor significativo en el diagnóstico de laboratorio de la dolencia. Los primitivos antígenos¹ consistentes en extractos de diferentes órganos de animales infectados con *Schizotrypanum cruzi*, han sido reemplazados por antígenos elaborados con cultivos del protozoario (antígeno hidroglicerinado de Kelsler, antígeno alcohólico de Romaña y Díaz, antígeno con mertiolato según Davis). Freitas ha perfeccionado la reacción empleando la técnica cuantitativa y obtuvo un antígeno con extracción benzénica que ha mostrado gran sensibilidad y alto grado de especificidad. El citado autor obtiene un 95% de positividad en casos seguros de enfermedad de Chagas. En nuestro material, la reacción de fijación del complemento empleando el antígeno según Davis, ha sido de 90% en casos seguros de enfermedad de Chagas, en fase crónica, comprobados por el xenodiagnóstico. Mae-

¹ Guerreiro, C., y Machado, A.: Da reação de Bordet e Gengou na Moléstia de Chagas como elemento diagnóstico, *Brasil Médico*, 27:225-226, 1913.

kelt², empleando la técnica de Freitas, obtiene un 97 % de positividad en casos crónicos parasitológicamente comprobados. En la fase aguda de la enfermedad de Chagas, hemos comprobado la positividad de la reacción en el 40 % de los casos a partir de la cuarta semana del comienzo de la enfermedad.

El valor de la reacción de fijación del complemento en el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas depende del logro de un antígeno de sensibilidad específica, de elevado poder antigénico y ausencia o muy baja actividad anticomplementaria y que sea trabajado por un personal con suficiente entrenamiento en este tipo de reacciones serológicas.

Reacción anti-critidia

Scorza y colaboradores³ han aplicado la técnica de la prueba de la tinción de Sabin y Feldman (Dye tests) en la toxoplasmosis al diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas en fase crónica, y estudiaron la acción de sueros de chagásicos sobre la estructura intracelular de las formas de cultivos de *Schizotrypanum cruzi* con el azul de metileno y el azul de toluidina a pH 11,0 como colorantes vitales. La incubación de las formas parasitarias con los sueros inactivados de chagásicos, agregando suero fresco de cobayo e incubando la mezcla en baño de María a 37°C., demuestra, después de la coloración vital, alteraciones intracitoplásmicas en los cultivos de *Schizotrypanum cruzi* que impiden la coloración de las granulaciones. En los casos de enfermedad de

Chagas estudiados por los citados autores, la reacción ha sido positiva en el 100 % de los casos. Nosotros hemos iniciado investigaciones comparativas entre este tipo de reacción, la reacción de fijación del complemento y el xenodiagnóstico en las formas crónicas de la enfermedad de Chagas, pero no estamos aún en condiciones de informar acerca de los resultados con este nuevo método de diagnóstico, que ha venido a ampliar el campo de acción en la inmunología de esta enfermedad.

Como conclusión sostenemos el siguiente criterio en lo que respecta al diagnóstico de la enfermedad de Chagas por procedimientos de laboratorio. A pesar del adelanto de estas investigaciones, el diagnóstico de esta enfermedad constituye muchas veces un serio problema para el clínico. Al lado de casos con síntomas característicos que permiten sospechar la dolencia, existen otros, muy numerosos por cierto, sin signos o síntomas que indiquen la existencia de la infección y en los cuales el diagnóstico sólo puede ser establecido por exámenes especializados de laboratorio. Aun en casos con sospecha clínica bien fundada, la demostración del *Schizotrypanum cruzi* tropieza en ocasiones con dificultades. En la fase aguda, el diagnóstico parasitológico es generalmente fácil por medio de la gota gruesa, aunque es necesario tener presente que, por lo general, la densidad parasitaria es baja y con tendencia a la disminución progresiva a medida que avanza la infección. Además de la gota gruesa, es recomendable en estos casos recurrir al hemocultivo, al xenodiagnóstico y a inoculaciones experimentales en animales sensibles. En las formas crónicas de la enfermedad de Chagas, debe recurrirse especialmente al xenodiagnóstico y a la reacción de fijación del complemento.

RESUMEN

Se hace una evaluación de los siguientes procedimientos de laboratorio empleados en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas: 1) examen de la sangre en fresco y coloreada; 2) xenodiagnóstico; 3) inoculaciones experi-

² Maekelt, G. A.: Diagnóstico de la enfermedad de Chagas por procedimientos de laboratorio. Gaceta Médica de los Hospitales Nacionales, 65-97, Valencia, Venezuela, 1957.

³ Scorza, J. V.; Alvarez, Argonis; Ramos, Italia, Díaz Vázquez, A.; Dager, Cecelia 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. En "Investigaciones sobre Enfermedad de Chagas en San Juan de los Morros, Estado Guárico, Venezuela". Recopilación, fascículo VI, 121-134, Imprenta Nacional Edit., Caracas, Venezuela, 1958.

mentales en animales sensibles; 4) hemocultivo; y 5) reacciones serológicas. El trabajo se funda en investigaciones llevadas a cabo de 1936 a 1958. El examen de la sangre en fresco y coloreada (gotas gruesas) es el procedimiento de elección en la fase aguda de la enfermedad. En casos con sospecha clínica y epidemiológica y negativos a este examen, se recomiendan el xenodiagnóstico, inoculaciones experimentales en animales sensibles (especialmente el cachorro de perro) y reacciones de precipitación, empleando como antígeno la fracción de polisacárido de cultivos de *Schizotrypanum cruzi*. En las formas crónicas de la enfermedad, se debe recurrir al xenodiagnóstico y a la reacción de fijación del complemento. En el material estudiado, un 40 % de casos crónicos dejaron de ser comprobados por el xenodiagnóstico. Repitiendo periódicamente este método de examen y aumentando el número de comidas del insecto vector, el porcentaje de negatividad descende al 20-30 %. De un total de 20.485 xenodiagnósticos hechos por el autor en un lapso de 22 años, incluso encuestas epidemiológicas de campo y pruebas de rutina en casos sospechosos, empleando en las pruebas un total aproximado de 250.000 especímenes de *Rhodnius prolixus* de cría, se han compro-

bado 1.600 casos de enfermedad de Chagas en fase crónica (7,80 %), lo cual no expresa el porcentaje real de la tripanosomiasis en el material, por los motivos anotados. Las inoculaciones experimentales en animales sensibles y el hemocultivo no son procedimientos recomendables para el diagnóstico de rutina de la enfermedad. Las inoculaciones practicadas al cobayo y al cachorro de perro con sangre citratada procedente de 40 casos crónicos, sólo suministraron resultados positivos en cinco casos (12,50 %) en el cachorro de perro, que se mostró más sensible que el cobayo a las cepas venezolanas de *Schizotrypanum cruzi*. En 100 casos seguros de enfermedad de Chagas, en los cuales se practicó el hemocultivo (gelosa nutritiva glucosada según Davis), sólo se aisló el *S. cruzi* en 16 casos (16 %). Las reacciones de aglutinación mostraron títulos variables e inconstantes. Las reacciones de precipitinas, empleando un extracto de polisacárido de cultivos de *S. cruzi*, fueron positivas en 34 de 36 casos de enfermedad en fase aguda (94,44 %), mientras que en 52 casos crónicos la reacción fue positiva sólo en 5 (9,61 %). La reacción de fijación del complemento fue positiva en el 40 % de los casos agudos y en el 90 % de los casos crónicos.

BIBLIOGRAFIA

- Brumpt, E.: Oxenodiagnóstico—Aplicação ao diagnóstico de algumas infeções parasitarias y em particular a Trypanosomose de Chagas, *Ann. Paulistas Med. y Cir.*, 3:97-102, 1914.
- Chagas, Carlos: Nova Trypanosomoses humana—Estudos sôbre a morfologia o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n.gen., n.sp., agente etiológico da nova entidade mórbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1:159-218, 1909.
- Davis, D. J.: An improved antigen for complement fixation in American Trypanosomiasis. *Pub. Health Rep.*, 58:775-777, 1943.
- Dias, E.: Estudos sôbre *Schizotrypanum cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 28:1-110, 1934.
- Dias, E.: Técnica do xenodiagnóstico na Moléstia de Chagas, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 35:335-342, 1940.
- Freitas, J. L. Pedreira de: Contribuição para o estudo do diagnóstico da Moléstia de Chagas por processos de laboratório. 1 folleto, Universidad de São Paulo, Facultad de Medicina, Edit. Brasil, 1947.
- Freitas, J. L. Pedreira de: Reação de fixação do complemento para o diagnóstico da Moléstia de Chagas pela técnica quantitativa, *Folia Clin. e Biol.*, 16:192-198, 1950.
- Galliard, H.: Remarques sur la culture de *Trypanosoma cruzi* Chagas. *Ann. Parasit. (Paris)* 7:367-376, 1939.
- Kelser, R. A.: A complement fixation test for Chagas Disease employing an artificial culture antigen, *Am. Jour. Trop. Med.*, 16:405-416, 1936.
- Laveran, A., y Mesnil, F.: *Trypanosomes et Trypanosomiasis*, Masson et Cie, 2a. Ed., París, 1912.
- Maekelt, G. A., y López J. E.: Reacción de desviación del complemento para el diagnóstico de las formas crónicas de la enfermedad de Chagas, *Act. Cient. Venez.*, 7:128-130, 1956.
- Mayer, M., y Rocha Lima, H. da: Zum Verhalten von *Schizotrypanum cruzi* in warm bluttern

- and arthropoden. *Archifs-u. Tropenhyg.* (Hamburgo, Alemania) 18:101-136, 1914.
- Mazza, S.: Métodos diagnósticos de la enfermedad de Chagas; valor y oportunidad de cada uno de ellos. VI Congreso Nacional de Medicina, Córdoba, Argentina, 1938. *Actas y Trabajos*, 3:155-159, 1940.
- Muniz, J., y Freitas, G. D.: Contribuição para o diagnóstico da Doença de Chagas pelas reações de imunidade. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 41:303-333, 1944.
- Muniz, J. y Freitas, G. D.: Contribuição para o diagnóstico da Doença de Chagas pelas reações de imunidade. II: Isolamento de polisacarídeos de *Schizotrypanum cruzi* e de outros Trypanosomídeos, seu comportamento nas reações de precipitação, de fixação do complemento e de hipersensibilidade. Os testes de floculação (Sublimado e formol gel). *Revista Brasileira de Biologia*, 4:421-438, Brasil.
- Muniz, J., y Freitas, G. D.: Estudos sobre a imunidade humoral da Doença de Chagas, *Brasil Méd.*, 60:1-14, 1946.
- Pifano, C., Félix: El diagnóstico parasitológico de la Enfermedad de Chagas. Estudio comparativo entre la gota gruesa, el xenodiagnóstico, el hemocultivo y las inoculaciones experimentales en animales sensibles, *Arch. Venez. Patol. Trop. y Parasit. Méd.*, (Caracas) II:2, 121-156, 1954.
- Pifano C., Félix: Nueva tripanosomiasis humana de la región neotrópica producida por el *Trypanosoma rangeli*, con especial referencia a Venezuela, *Arch. Venez. Patol. Trop. y Parasit. Méd.*, II:2, 89-120, 1954.
- Romaña, C., y Días, E.: Reação do fixação do complemento na Doença de Chagas com antígeno alcoólico de cultura de *Schizotrypanum cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 37:1-10, 1942.
- Wenyon, C. M.: *Protozoology*, 2 Vols., Bailliere, Tindale and Cox. Edit. Londres, 1926.

EVALUATION OF LABORATORY TECHNIQUES USED IN THE DIAGNOSIS OF CHAGAS' DISEASE (Summary)

The author makes an evaluation of the following laboratory techniques used in the diagnosis of Chagas' Disease: (1) examination of fresh blood smears and staining of slides; (2) xenodiagnosis; (3) experimental inoculations of susceptible animals; (4) blood cultures, and (5) serological reactions. This paper is based on the research carried out by the author from 1936 to 1958. The examination of fresh blood and thick film is the best method in the acute stages of the disease. When the diagnosis is clinically and epidemiologically consistent, and the above test is negative, xenodiagnosis is recommended, aided by experimental inoculations in susceptible animals (especially puppies) and precipitin reactions, using as antigen the polysaccharid fraction of *Schizotrypanum cruzi* cultures. In the chronic stages of the disease, xenodiagnosis and complement fixation tests are recommended. In the material studied, 40 per cent of chronic cases gave negative results with xenodiagnosis. When this method was repeated and the number of blood meals of the vector insects increased, the negative percentages decreased to 20-30 per cent. Of a total of 20,485 xenodiagnoses

made in a period of 22 years, including epidemiological surveys in the field and routine tests on suspects, approximately 250,000 specimens of *Rhodnius prolixus* bred in the laboratory being used in the test, 1,600 cases of Chagas' disease in the chronic stage (7.8%) were detected. This does not express the true percentage of trypanosomiasis in the material, for the reasons explained. Experimental inoculations in susceptible animals and blood cultures are not recommended in routine examinations. The inoculation of guinea pigs and puppies with citrated blood from 40 chronic cases gave positive results in only 5 cases (12.5%) in puppies, which were more susceptible than guinea pigs to Venezuelan strains of *Schizotrypanum cruzi*. In 100 positive cases in which blood cultures were used, *Schizotrypanum cruzi* was isolated in only 16 cases (16%). The agglutination test showed variable and inconstant titers. Precipitin tests, with the polysaccharid extract of *Schizotrypanum cruzi* culture, were positive in only 5 cases (9.61%). The complement fixation test was positive in only 40 per cent of acute cases and in 90 per cent of chronic cases.