

# La Reacción de Inmunofluorescencia en el Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas\*

FRANCISCO BIAGI F., JORGE TAY Y  
RODOLFO MARTINEZ MURRAY

En la actualidad sólo se dispone de la reacción de fijación del complemento, como método inmunológico para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en su fase crónica. Como en ésta la parasitemia es esporádica y escasa, los procedimientos parasitoscópicos son de poca utilidad. Y la reacción de fijación del complemento es costosa y requiere mucha mano de obra; de aquí que siempre se haya deseado disponer de otro método de diagnóstico a la vez útil y más fácil de realizar.

Recientemente se ha aplicado la técnica de la inmunofluorescencia en el diagnóstico de enfermedades parasitarias (1-3). Fife y Muschel emplearon, con buenos resultados, este procedimiento en la enfermedad de Chagas usando como antígeno una suspensión de leptomonas obtenidas de cultivo (4). También en fecha reciente Sadún y colaboradores hicieron la reacción empleando tripanosomas de sangre circulante (5); esto implica que los parásitos tienen que mantenerse en cultivo o en animales, lo cual, por problemas técnicos y riesgos de infección del personal de laboratorio, hace que dicha reacción no pueda emplearse más que en laboratorios especializados.

En el presente trabajo se evalúa la utilidad de la reacción de inmunofluorescencia, empleando como antígeno formas en leishmania de *Trypanosoma cruzi*, contenidas en cortes histológicos de miocardio de ratón infectado. Estos cortes histológicos pueden guardarse por mucho tiempo, de modo que la reacción resulta muy fácil de realizar en cualquier laboratorio.

---

Del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

## Material y métodos

Se obtuvieron sueros de: a) personas de la población de Tetitlán, Gro., México, en donde existe con cierta frecuencia la enfermedad de Chagas, b) personas con miocarditis de etiología en estudio, c) personas con miocarditis reumática procedentes de zonas libres de enfermedad de Chagas, d) personas con padecimientos del tejido conectivo, tales como lupus eritematoso, artritis reumatoide, macroglobulia e infarto de miocardio, que también procedían de zonas libres de la enfermedad de Chagas, y e) personas sanas procedentes de regiones exentas de la enfermedad de Chagas.

En el presente trabajo se intentó relacionar la reacción de fijación del complemento, que es altamente específica en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, con los resultados de la reacción de inmunofluorescencia.

La reacción de fijación del complemento se hizo según la técnica de Wasserman-Kolmer, y con antígeno de *T. cruzi* proporcionado por el Dr. Amador Neghme, del Departamento de Parasitología de la Universidad de Chile.

La reacción de inmunofluorescencia por el método indirecto, se hizo empleando como reactivos el suero problema, y suero antihumano fluorescente, y como antígeno, cortes histológicos que contenían abundantes nidos de formas en fase leishmania, de *T. cruzi*.

El suero antihumano se preparó inyectando a conejos sanos una mezcla de sueros

---

\* Trabajo realizado con fondos del Donativo 2E-210 de los Institutos Nacionales de Higiene de Estados Unidos.

Manuscrito recibido en septiembre de 1963.

CUADRO 1 — Resultados de la reacción de inmunofluorescencia (R.I.F.) en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, comparados con la reacción de fijación de complemento (R.F.C.) con antígeno de *Trypanosoma cruzi*.

Grupos	R.F.C.	No. de casos	R.I.F. Positiva	
			No.	%
Habitantes de Tetitlán, Gro., México	+	17*	15	88
	-	150	3	2
Casos de miocarditis de etiología en estudio	+	1**	1	
	-	9	0	0
Casos de miocarditis reumática	-	25	0	0
Enfermedades del tejido conectivo	+	1	0	
	-	8	0	0
Personas sanas	-	25	0	0

\* Estos pueden considerarse como casos de enfermedad de Chagas.

\*\* Por datos epidemiológicos, clínicos y serológicos, se concluyó que era un caso de enfermedad de Chagas.

de tres personas sanas, que siempre habían vivido en zonas libres de la enfermedad de Chagas y presentaron tres exámenes coproparasitoscópicos negativos. La aparición de anticuerpos en los conejos se demostró mediante la precipitación por difusión en placa de agar (6). A este suero antihumano, se conjugó isotiocinato de fluoresceína según la técnica descrita por Marshall y colaboradores (7). Como coloración de contraste, se usó conjugado rhodamina-albúmina para teñir las fibras cardíacas, el que se preparó de acuerdo con la técnica de Smith y colaboradores (8).

Los cortes histológicos con parásitos, tenían 10 micras de espesor; se hicieron por la técnica estándar de inclusión de parafina, sin emplear albúmina ni gelatina para fijar los cortes en el portaobjetos. Los cortes fueron hechos de miocardio de ratón infectado, en el laboratorio, con una capa de *T. cruzi* procedente de Tetitlán, Gro.; algunos cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina para corroborar la abundancia de los parásitos.

Los cortes se guardaron a la temperatura ambiente, conservando la parafina.

El procedimiento seguido en la reacción de inmunofluorescencia fue como sigue:

1) El corte histológico se pasa por 3 baños de xilol, de 10 minutos cada uno, para eliminar la parafina; a continuación se pasa por 2 baños de alcohol absoluto, 2 baños de alcohol de 95°C. y un baño de alcohol de 70°C. (5 minutos cada uno). Finalmente, se deposita en un recipiente con solución salina tope\* con pH de 7,0 a 7,3.

2) Se coloca el portaobjetos con el corte histológico en posición horizontal en una cámara húmeda, y se le añade 0,1 ml. de suero problema, cubriendo el corte histológico. Se incuba a 37°C. durante una hora.

3) Se descarta el suero y se lava cuidadosamente la preparación con solución salina tope, se coloca de nuevo la preparación en la cámara húmeda cubriendo el corte con 0,1 ml. de suero antihumano fluorescente; se incuba a 37°C. durante 15 minutos, al cabo de los cuales se vuelve a lavar la preparación.

4) Se repite la operación cubriendo el corte con 0,1 ml. de rhodamina-albúmina; se incuba a 37°C. durante 15 minutos y se lava.

5) Se añade una gota de glicerina tope de pH 7,0 a 7,3 y se coloca un cubreobjetos.

6) Se observa en cualquier microscopio de fluorescencia.

El color rosado de la rhodamina hace fácil de enfocar la preparación, pues se encuentra tiñendo las fibras cardíacas.

Cuando el suero problema tiene anticuerpos contra *T. cruzi*, las formas en leishmania muestran, de manera evidente, la fluorescencia verde de la fluoresceína. Y cuando el suero problema no tiene anticuerpos, las formas en leishmania no son visibles con la luz ultravioleta; si bien pueden ser localizadas fácilmente en la preparación, emple-

\* Solución salina tope (pH 7,0 a 7,3):

Cloruro de sodio	8,5 g.
Fosfato disódico anhidro	2,5 g.
Fosfato monosódico monohidratado	0,6 g.
Agua destilada c.b.p.	1.000 ml.

ando la iluminación de contraste de fases o el campo claro.

Los reactivos (incluso los cortes histológicos) pueden conservarse al menos durante un año. La técnica es fácil y rápida y las lecturas positivas se diferencian de las negativas sin dificultad.

### Resultados y comentarios

En el Cuadro 1 se dan los resultados obtenidos. Las personas de Tetitlán que dieron reacción de fijación del complemento positiva y que pueden ser considerados como casos de enfermedad de Chagas, en su mayoría dieron reacción de inmunofluorescencia positiva. Los únicos 2 casos que dieron reacción de fijación del complemento positiva y reacción de inmunofluorescencia negativa, presentaron la fijación del complemento a bajo título (1:16).

El paciente de miocarditis en estudio que presentó ambas reacciones positivas, se consideró finalmente como un caso de miocarditis chagásica, dado que además los datos clínicos y epidemiológicos apoyaron este diagnóstico.

Todos los casos que dieron fijación del complemento negativa dieron también inmunofluorescencia negativa; entre éstos se incluyeron personas con miocarditis reumática

con padecimientos que producen autoanticuerpos, y personas sanas que nunca habían estado expuestas a la infección por *T. cruzi*. Sólo un caso de artritis reumatoide, que nunca había vivido en zonas chagásicas, presentó reacción de fijación del complemento positiva; y sin embargo, la reacción de inmunofluorescencia fue negativa.

Considerando la muy buena concordancia entre ambas reacciones y considerando que la inmunofluorescencia es mucho más fácil de realizar y económica, creemos que conviene considerar la posibilidad de usar esta reacción para el diagnóstico inmunológico de la enfermedad de Chagas. Cabe añadir que el Dr. Elvio Sadún, quien visitó nuestro laboratorio cuando este trabajo estaba siendo terminado, comentó que es extraordinariamente ventajoso y práctico el uso de parásitos en cortes histológicos.

### Resumen

Se describe una nueva modalidad de la reacción de inmunofluorescencia como medio de diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas. Comparándola con la reacción de fijación del complemento, presenta una notable concordancia. Considerando ventajas prácticas, se plantea la posibilidad de emplearla como método de rutina en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

### REFERENCIAS

- (1) Anderson, R. I.; Sadún, E. H., y Williams, J. S.: Preserved cercarie in the fluorescent antibody (FA) test for schistosomiasis, *Exp. Parasit.*, 11(2-3):111-116, 1961.
- (2) Sadún, F. H.; William, J. S. y Anderson, R. I.: Fluorescent antibody technic for serodiagnosis of schistosomiasis in humans, *Proc. Soc. Exper. Bio. Med.*, 105:289-291, 1960.
- (3) Sadún, F. H.; Anderson, R. I., y Williams, J. S.: Fluorescent antibody test for the laboratory diagnosis of schistosomiasis in humans by using dried blood smears on filter paper, *Exp. Parasit.*, 11(2-3):117-120, 1961.
- (4) Fife, E. H. Jr., y Muschel, L. H.: Fluorescent-antibody technic for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection, *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 101:540-543, 1959.
- (5) Sadún, 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, *Jour. of Parasitol.*, 49(3):385-388, 1963.
- (6) Ouchterlony, O.: Diffusion in gel methods for immunological analysis, *Progress in Allergy*, 5:1-78, 1958.
- (7) Marshall, J. D.; Eveland, W. C., y Smith, C. W.: Conjugation of protein with fluorescein isothiocyanate, *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 98:898, 1958.
- (8) Smith, C. W.; Marshall, J. D., y Eveland,

W. C.: Preparation of Lissaminerhodamine albumin conjugate for use as a counterstain

in immunofluorescence, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 102:179-181, 1959.

---

### **The Immunofluorescence Test in the Diagnosis of Chagas' Disease (Summary)**

This paper describes a way of using the immunofluorescence test for the serological diagnosis of Chagas' disease. There is a close correspondence between the results of this test

and of the complement fixation test. In view of its practical advantages, it could be used as a routine method of diagnosing Chagas' Disease.

---

If any means can ever be found to render men wiser and more ingenious than hitherto, I believe that it is in Medicine they must be sought . . . and that we could free ourselves from an infinity of maladies, of body as well as mind, and perhaps also even from the debility of age, if we had sufficiently ample knowledge of their causes and of all remedies provided for us by Nature.

*René Descartes*

Si algún medio pudiera encontrarse para hacer a los hombres más sabios y más ingeniosos que hasta aquí, creo que es en la medicina donde debe buscarse . . . podríamos liberarnos de una infinidad de enfermedades del cuerpo, del espíritu y tal vez también aun de las debilidades de la edad, si tuviéramos conocimiento amplio de sus causas, así como de todos los remedios que nos provee la naturaleza.

*René Descartes*