

LA REACCION DE INMUNOFLUORESCENCIA EN EL DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS-MAZZA ¹

Raúl A. Girola,² Gladys Wynne de Martini³ y Aldo Milic⁴

Los resultados de este trabajo, sumados a los de otros autores, muestran que la reacción de inmunofluorescencia puede ser utilizada como método de rutina para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas-Mazza.

A pesar de los años transcurridos desde que se comenzó a aplicar la técnica de inmunofluorescencia al diagnóstico bacteriológico y serológico, y a diferencia de la amplia experiencia recogida en otras afecciones, la bibliografía mundial informa sólo esporádicamente con respecto a su utilización en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas-Mazza y siempre con referencia a un pequeño número de casos.

Con el fin de aumentar la escasa información existente, y de obtener mayores elementos de juicio que permitan incorporar esta reacción al diagnóstico de rutina de una enfermedad tan difundida, se planteó el siguiente estudio, destinado específicamente a estimar la concordancia entre la reacción de fijación del complemento (RFC), procedimiento más complejo que se usa habitualmente para el diagnóstico serológico de la tripanosomiasis americana, y la reacción de inmunofluorescencia (RIF).

Material y métodos

Sueros. Se emplearon sueros enviados por los médicos al Instituto Nacional de Microbiología y al Laboratorio Sanitario del Ministerio de Asistencia Social y Salud Pú-

blica "Dr. M. Fatała Chaben", para el diagnóstico de rutina de la enfermedad de Chagas mediante la técnica de fijación de complemento.

Antígenos para la RIF. Para la preparación del antígeno se utilizó *T. cruzi*⁵ cultivado en el medio preconizado por Muniz y Freitas (1). Se recogió el sobrenadante que contenía los parásitos, después de 3 ó 4 días de incubación a 27°C. Se centrifugó durante 15 minutos a 4,000 rpm y después de decantar el sobrenadante, se resuspendieron los tripanosomas en una solución de NaCl 0.15M más 0.1% de formol; se centrifugó nuevamente y se lavó varias veces con solución de NaCl 0.15M con la siguiente técnica: se colocó 0.01 cc de la suspensión sobre un portaobjeto limpio y se cubrió con un cubreobjeto de 22×22 mm. Se examinó a 450× y se contó el número de tripanosomas en 10 campos, debiéndose obtener una suspensión que tuviera entre 15 y 20 tripanosomas por campo.

Para la preparación de los portaobjetos empleados en la reacción, se coloca 0.02 cc de la suspensión obtenida sobre portaobjetos limpios, debidamente desengrasados, dentro de círculos de 1 cm de diámetro, marcados con diamante. Se deja secar y se fija por calor.

Aunque la suspensión de tripanosomas no se conserva en condiciones óptimas por más de tres o cuatro días a 4°C, los portaobjetos

¹ Este trabajo fue realizado en el Instituto Nacional de Microbiología "Carlos G. Malbrán", Buenos Aires, Argentina, y presentado en las Segundas Jornadas Entomoepidemiológicas Argentinas, Salta, octubre de 1965.

² Segundo Jefe de la División Serología del Instituto Nacional de Microbiología "Carlos G. Malbrán".

³ Jefe de la referida División Serología.

⁴ Jefe del Departamento de Epidemiología del referido Instituto.

⁵ Cepa provista por el Dr. A. Lorenzo, Director del Laboratorio Central de Serología del Uruguay.

preparados de la manera descrita se mantienen sin alteraciones por lo menos dos meses, siempre y cuando se coloquen en un desecador a dicha temperatura.

Técnica de la RFC. Para las reacciones de fijación del complemento se utilizó un antígeno preparado según el método de David (2) modificado por Cerisola (3).

Se utilizaron dos técnicas diferentes para la reacción:

a) Se ensayaron 411 sueros por la técnica de Eagle (4) y Assis (5), modificada por Deffis (6), que, al iniciar este estudio, era empleada como rutina en nuestro laboratorio. Únicamente varió el tiempo de incubación que fue de 1 hora a 6 a 10°C y 1 hora a 37°C.

b) De aquellos, 329 fueron ensayados simultáneamente por la técnica de Kolmer (7), de mayor sensibilidad que la precedente, y se utilizó el mismo antígeno.

Preparación de antiglobulina humana (AGH) marcada. La AGH se obtuvo mediante la inoculación de conejos con globulina gamma humana, con la cual se lograron títulos de 12,800 y 25,600, medidos por hemaglutinación pasiva (8). Se precipitó la AGH con sulfato de amonio a media saturación y, después de dializada, se copuló con isotiocianato de fluoresceína.⁶

Para el marcado de un lote se siguió la técnica de Riggs (9) y para un segundo lote se empleó una de las variaciones de técnica sugeridas por Lewis (10). El exceso de colorante fue eliminado por diálisis durante una noche, pasaje por columna de Sephadex G-25 fino, y posterior absorción con polvo de tejido de cerebro e hígado de ratón desecado.

La relación fluoresceína/proteína (F/P) fue 14.9 para el primer lote y 15.7 para el segundo.

Equipo microscópico. Se empleó un microscopio Ortholux Leitz, ocular 12×, objetivo 40×, filtro U.V. de 2 mm (UG 1), filtro

barrera GG 9 y lámpara de luz ultravioleta Philips CS 150 W.

Técnica de la RIF. Se siguió la técnica indirecta. A tal fin, sobre el portaobjeto con 0.02 cc de antígeno (véase la descripción previa), se colocó 0.03 cc de suero del paciente, diluido 1/64⁷ en solución salina estabilizadora (SSE) de pH 7.2⁸ incubándose en cámara húmeda a 37°C por media hora aproximadamente. Luego se lavó con SSE dos veces y finalmente con agua destilada, secándose con papel de filtro. Después se agregó 0.03 cc de la solución de AGH marcada, se incubó, se lavó y se secó de igual manera. Los preparados se montaron con glicerina al 20% en SSE, pH 8, y se conservaron en la oscuridad a 4°C hasta el momento de su observación (no más de dos horas).

Controles utilizados. En las reacciones se utilizaron los siguientes controles:

- 1) Antígeno-suero positivo-AGH marcada.
- 2) Antígeno-suero negativo-AGH marcada.
- 3) Antígeno-SSE-AGH marcada.

Lectura de las reacciones. En el caso de los sueros positivos, los tripanosomas se observaron con la típica fluorescencia amarillo-verdosa; los sueros negativos y el control 3 presentaron una coloración gris verdosa sin fluorescencia. Las lecturas fueron efectuadas en forma independiente por dos o más de los autores, en el mismo día en que se realizaban las reacciones. Cuando la lectura de dos observadores no coincidía, la reacción era calificada de dudosa y se repetía, adoptándose el mismo criterio para las reacciones calificadas de dudosas en forma coincidente por ambos lectores. Cuando la lectura no concordaba con los resultados de la RFC se repetían ambas reacciones. En todos los casos sin excepción, las lecturas se hicieron

⁷ Esta dilución fue elegida después de ensayos con sueros negativos y controles para asegurar la ausencia de fluorescencia inespecífica.

⁸ Solución salina estabilizadora: KH_2PO_4 0.01M; Na_2HPO_4 0.01M; NaCl 0.15M.

⁶ "Dajac", Borden Chemical Company.

CUADRO 1—Resultados comparativos entre las reacciones de IF y FC según la técnica de Eagle y Assis modificada por Deffis.

FC	IF						Total
	Positiva		Negativa		Dudosa		
	No.	%	No.	%	No.	%	
Positiva.....	93	94	2	2	4	4	99 (100%)
Negativa.....	7	3	223	97	—	—	230 (100%)
Total.....	100	—	225	—	4	—	329

en forma ciega, es decir, sin conocimiento por parte de los observadores de los resultados de la RFC.

Resultados

Si bien se estudiaron en total 411 sueros, 82 fueron sólo estudiados por IF y por la técnica de FC de Eagle-Assis-Deffis. Los 329 restantes fueron sometidos a las dos técnicas de FC, además de la de IF. Los resultados de los 82 sueros mencionados en primer término no difieren significativamente de los 329, por cuya razón nos referiremos solamente a estos últimos para presentar una comparación adecuada de la RIF con las dos variantes técnicas de la RFC (cuadros 1 y 2).

Con el fin de estudiar la reproducibilidad de la RIF, se realizó la misma por duplicado en 75 sueros, que dieron resultados concordes.

Discusión

En 1959, Fife y Muschel (11) emplearon por primera vez la técnica de IF para la detección de anticuerpos contra *T. cruzi*, hallando en 40 casos de enfermedad de Chagas, perfectamente comprobados por xenodiagnóstico, una concordancia casi absoluta entre el diagnóstico previo y el resultado de la RIF (97.5%). Sobre 90 casos control hallaron un 4% de resultados dudosos. Estos autores emplearon el método húmedo para la técnica indirecta de IF, pues encontraron que el método corriente daba un gran número de resultados dudosos o falsamente positivos. Compararon además los resultados obtenidos con la RIF y la RFC realizada con antígenos purificados, afirmando que la RIF es más sensible, aunque ligeramente menos específica; destacaron sin embargo que la RFC efectuada con antígenos

CUADRO 2—Resultados comparativos entre las reacciones de IF y FC según la técnica de Kolmer.

FC	IF						Total
	Positiva		Negativa		Dudosa		
	No.	%	No.	%	No.	%	
Positiva.....	100	95.2	1	1	4	3.8	105 (100%)
Negativa.....	—	—	224	100	—	—	224 (100)%
Total.....	100	—	225	—	4	—	329

comunes es aún menos específica que la RIF.

Posteriormente, en 1963, Sadún y colaboradores (12) describieron su experiencia en el diagnóstico de distintas tripanosomiasis por la RIF, utilizando como antígeno tripanosomas obtenidos por sangría de animales infectados. Sobre 36 casos documentados de enfermedad de Chagas, obtuvieron un índice de positividad de 92% y un 8% de dudosos. Sobre 108 pacientes de otras afecciones (esquistosomiasis, leishmaniasis, malaria, etc.) obtuvieron 1.8% de resultados positivos y 22.2% de dudosos. Por último, en 56 controles sanos hallaron un 12.5% de resultados dudosos.

Ese mismo año, Romaña (13) adoptó el método de inhibición de Goldman y efectuó la reacción en 63 sueros, utilizando cultivos de *T. cruzi* como antígeno. Comprobó un 96.8% de concordancia entre la RIF y la RFC.

Recientemente Biagi y colaboradores (14) utilizaron como antígeno cortes histológicos de miocardio de ratones infectados y lograron una concordancia del 88% entre ambas reacciones.

En el presente trabajo se empleó la clásica técnica indirecta de IF, utilizando como antígeno *T. cruzi* de cultivo, tanto por razón de su sencillez como de la escasa cantidad de tiempo y de reactivos necesarios para realizarlo, lo que no ocurre con la técnica recomendada por Fife y Muschel, que exige mayor cantidad de material y es más lenta. Las técnicas de Sadún y Biagi no se ensayaron porque para obtener antígeno era menester inocular animales, lo cual las hacía más complejas y tal vez pudiera contribuir a cierta inespecificidad.

El alto grado de inespecificidad hallado por Fife y Muschel en sus primeros trabajos, que los llevó a adoptar el método húmedo, fue también observado por nosotros al comienzo del presente, pero desapareció al empezar a usarse antígenos formolados, portaobjetos con una adecuada cantidad de antígeno y diluciones correctas de sueros.

Según la experiencia adquirida en este trabajo, la preparación del antígeno tiene una importancia fundamental en la precisión de las lecturas pues, si este aspecto no se atiende con especial esmero (cultivos jóvenes y suspensión inicial con solución formolada), un alto porcentaje de las reacciones podrá ser de difícil interpretación y aun dar resultados incorrectos. Algunos lotes de antígeno viejo, o incorrectamente conservados, pueden aumentar notablemente el porcentaje de lecturas dudosas. En estos casos bastó cambiar la partida de antígeno para suprimir las dificultades.

Al comparar estos resultados con los de los autores que trabajaron previamente en el tema, se comprueba la similitud de las concordancias obtenidas. En dicha comparación llama inmediatamente la atención el significativo número de reacciones dudosas que obtuvo Sadún, a diferencia de lo observado por los autores de este trabajo y por otros. La diferencia mencionada puede tener su origen en distintos aspectos, pero fundamentalmente en los referentes a la preparación del antígeno.

Es imposible opinar categóricamente con respecto a la especificidad de la RIF, por no haberse contado con sueros de enfermos confirmados por aislamiento del parásito. Solamente en 10 casos, en que la RIF y la RFC fueron positivos, se conocieron los antecedentes clínicos y epidemiológicos.

No se investigó la precocidad de la reacción, pero en el caso de una paciente que había sido picada por vinchucas (*Reduvius infestans*) y presentaba un chagoma de involución, la RIF resultó positiva, mientras que la RFC de rutina fue negativa. Este hecho, por su analogía con la presencia de anticuerpos fluorescentes antes que la de los fijadores del complemento en sífilis, ha motivado la preparación de un proyecto de investigación para determinar este punto.

En unos pocos sueros se investigó la sensibilidad de ambas reacciones, expresadas por la máxima dilución en la que era posible

obtener reacciones positivas. Se comprobó que la RIF era positiva a diluciones mayores (tomando como dilución inicial del suero para esta reacción 1/64) que lo observado en la RFC, pero el número pequeño de sueros ensayados no permite llegar a una conclusión definitiva.

Resumen y conclusiones

Los resultados del estudio verificado en 329 sueros indican que entre la reacción de fijación del complemento y la reacción de inmunofluorescencia se obtuvo una concordancia del 96 al 98%. La reacción de inmunofluorescencia se realizó según la técnica indirecta, empleando como antígeno *T. cruzi* de cultivo, y la reacción de fijación del complemento por la técnica de Kolmer y por la de Eagle y Assis modificada por Deffis, efectuadas con antígeno de Davis según la modificación de Cerisola.

Del estudio realizado se desprende que:

1. La investigación permitió establecer una concordancia del 96% entre la RIF y

la RFC (según Eagle, Assis y Deffis) y del 98% entre la RIF y la RFC (según Kolmer).

2. Si bien una adecuada lectura de la RIF exige cierto adiestramiento, este no es difícil de obtener y las reacciones son de muy fácil ejecución.

3. La preparación de la antiglobulina humana marcada con isotiocianato de fluoresceína es sencilla, la cantidad de reactivos requerida es mínima, y en el término de dos horas es posible contar con los resultados.

4. La RIF puede efectuarse sobre muestras pequeñísimas de sangre obtenidas por punción digital, absorbidas en pequeños discos de papel secante, y luego eluidas (15).

5. La obtención de resultados correctos depende de varios factores, tales como la preparación de antígenos, su conservación adecuada y la experiencia del observador al realizar la lectura.

6. Los resultados, sumados a los de otros autores, permiten aseverar que la RIF puede ser utilizada como método de rutina para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas-Mazza. □

REFERENCIAS

- (1) Muniz, J., Freitas G. de "Contribuição para o diagnóstico da doença de Chagas pelas reações de aglutinação o de fixação do complemento." *Mem Inst Cruz* 41:303, 1944.
- (2) Davis, D. J. "An Improved Antigen for Complement Fixation in American Trypanosomiasis." *Public Health Rep* 58:775, 1943.
- (3) Cerisola, J. A. y Rosenbaum, M. B. "La reacción de fijación de complemento para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas." *Prems Méd Arg* 45:1454, 1958.
- (4) Eagle, R. "Laboratory Diagnosis of Syphilis." St. Louis, Mo.: Ed. 1937.
- (5) Assis, A. de "Técnica de fixação do complemento na syphilis." *Arch Hyg* 6:49, 1936.
- (6) Deffis, M. "Una técnica para la reacción de fijación de complemento." Traducción de la Asociación Bioquímica Argentina, 1953.
- (7) Kolmer, J. A. y Lynch, E. R. "Cardiolipin Antigen in the Kolmer Complement Fixation test." *J Ven Dis Inf* 29:166, 1948.
- (8) Daniel, T. M., Weyand, J. G. y Stavitsky, A. B. "Micromethods for the Study of Proteins and Antibodies." *J Immunol* 90:741, 1963.
- (9) Riggs, J. C., Seiwald, R. J., Burkhalter, J. R. Downs, C. N., y Metcalf, G. "Isothiocyanate Compounds as Fluorescent Labeling Agents for Immune Serum." *Amer J Path* 34:1081, 1958.
- (10) Lewis, V. J., Jones, W. L. Brooks, J. S. y Cherry, W. B. "Technical Considerations in the Preparation of Fluorescent Antibody Conjugates." *Appl Microbiol* 13:343, 1964.
- (11) Fife, B. H. y Muschel, L. H. "Fluorescent Antibody Technic for Serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection." *Proc Soc Exp Biol Med* 101:540, 1959.
- (12) Sadún, E. H., Duxbury, R. C., T. S. y Anderson R. I. "Fluorescent Antibody Test for the Diagnosis of African and American Trypanosomiasis in Man." *J Parasit* 49:385, 1963.
- (13) Romaña, C. "Adaptación del método de inhibición de inmunofluorescencia de Goldman al diagnóstico de la enfermedad de Chagas." *Rev Soc Arg Biol* 39:128, 1963.
- (14) Biagi, F., Tay, J. y Martínez Murray, R. "La reacción de inmunofluorescencia en

el diagnóstico de la enfermedad de Chagas." *Bol Ofic Sanit Panamer* 57(3): 237-240, 1964.

(15) de Martini, G. J. W., Milic, A. y Girola,

R. A. "Reacciones serológicas y la utilización de papel secante para remisión de muestras de suero y sangre." (En prensa)

Immunofluorescence Diagnostic Tests for Chagas-Mazza Disease (Summary)

The results of a study of 329 sera show that there was a 96 to 98 per cent correlation between the complement fixation test (CFT) and the immunofluorescence test (IFT). For the immunofluorescence test indirect techniques were used, cultivated *T. cruzi* being employed as the antigen and for the complement fixation test the Kolmer method as well as the Eagle and Assis method modified by Deffis, using the Davis antigen as modified by Cerisola.

The study gave the following results:

1. The investigation showed that there was a 96 per cent correlation between the IFT and the CFT (according to Eagle, Assis and Deffis) and a 98 per cent correlation between the IFT and CFT (according to Kolmer).

2. Although the correct reading of the IFT calls for careful training, it is not difficult to

acquire and the tests are very easy to carry out.

3. The preparation of human antiglobuline, tagged with fluoresceine isothiocyanate, is simple; the amount of reagents needed is very small; and at the end of two hours it is possible to have the results.

4. IFT can be carried out with very small specimens of blood obtained by finger puncture, absorbed on small discs of blotting paper and then eluted.

5. Correct results depend on various factors, such as the preparation of the antigens, appropriate storage, and the experience of the observer in reading the tests.

6. In view of the results and those of other authors it is possible to state that IFT can be used as a routine diagnostic method for Chagas-Mazza Disease.

A Reação de Imunofluorescência no Diagnóstico da Doença de Chagas-Mazza (Resumo)

Os resultados do estudo realizado em 329 sôros indicam que, entre a reação de fixação de complemento (RFC) e a reação de imunofluorescência (RIF) se obteve uma concordância de 96 a 98%. A reação de imunofluorescência foi realizada segundo a técnica indireta, empregando-se como antígeno *T. cruzi* de cultura; e a reação de fixação do complemento, pela técnica de Kolmer e pela técnica de Eagle e Assis modificada por Deffis, realizadas com antígeno de Davis segundo a modificação de Cerisola.

Do estudo realizado infere-se que:

1. A pesquisa permitiu estabelecer uma concordância de 96% entre a RIF e a RFC (segundo Eagle, Assis e Deffis) e de 98% entre a RIF e a RFC (segundo Kolmer).

2. Se bem que uma leitura adequada da RIF exija certo treinamento, êsse treinamento

não é difícil de obter e as reações são de execução muito fácil.

3. A preparação da anti-globulina humana marcada com isotiocianato de fluoresceína é simples; a quantidade de reagentes requerida é mínima; e, ao cabo de duas horas, é possível dispor dos resultados.

4. A RIF pode ser realizada em pequeníssimas amostras de sangue obtidas por punção digital, absorvidas em pequenos discos de papel mataborrão, e em seguida eluídas.

5. A obtenção de resultados corretos depende de vários fatores, tais como a preparação de antígenos, sua adequada conservação e a experiência do observador ao realizar a leitura.

6. Os resultados, somados aos de outros autores, permitem assegurar que a RIF pode ser utilizada como método de rotina para o diagnóstico da doença de Chagas-Mazza.

A Reação de Imunofluorescência no Diagnóstico da Doença de Chagas-Mazza (Résumé)

Les résultats de l'étude vérifiée de 329 sérums indiquent que l'on a obtenu une concordance de 96 à 98% entre la réaction de fixation du

complément (RFC) et la réaction d'immunofluorescence (RIF). La réaction d'immunofluorescence a été réalisée selon la méthode

indirecte, en utilisant comme antigène *T. cruzi* de culture et la réaction de fixation du complément par la méthode de Kolmer et par la méthode de Eagle et Assis modifiée par Deffis, effectuées avec l'antigène de Davis selon la modification de Cerisola.

L'étude a permis d'établir les faits suivants:

1. L'enquête a permis d'établir une concordance de 96% entre la RIF et la RFC (selon Eagle, Assis et Deffis) et de 98% entre la RIF et la RFC (selon Kolmer).

2. Bien qu'une lecture satisfaisante de la RIF exige une certaine formation, il n'est pas difficile de l'acquérir, et les réactions sont d'une exécution facile.

3. La préparation de l'antiglobuline humaine, marquée au isothiocyanate de fluorescéine, est

simple; la quantité de réactifs nécessaires est minime et il est possible d'obtenir les résultats dans l'espace de deux heures.

4. La RIF peut s'effectuer sur de très petits échantillons de sang obtenus par ponction digitale, absorbés dans de petits disques de papier buvard et élavés ensuite.

5. L'obtention de résultats corrects dépend de divers facteurs, notamment la préparation des antigènes, leur conservation satisfaisante et l'expérience de l'observateur en matière de lecture.

6. Les résultats, qui viennent s'ajouter à ceux des autres auteurs, permettent d'affirmer que la RIF peut être utilisée comme méthode courante pour le diagnostic de la maladie de Chagas-Mazza.