LA ENFERMEDAD DE CHAGAS Y SU IMPORTANCIA EN EL LABORATORIO

*Dra. Leticia González Carrión (Academia Ecuatoriana de Medicina)
Gustavo Cevallos Paredes (Servicio de Cardiología del Hospital Militar), Quito*

El diagnóstico serológico y su importancia

El diagnóstico serológico es fundamental, principalmente en encuestas epidemiológicas. La aplicación del diagnóstico serológico en casos de miocardiopatías crónicas y la evaluación estadística de sus resultados nos han confirmado la sospecha de que la gran mayoría de las miocardiopatías rurales de Latinoamérica es de origen chagásico (1—16).

El diagnóstico serológico es así de gran importancia tanto para la clínica (19—20) como para los servicios preventivos. La comprobación de las macromanoglobulinas específicas contra el *Trypanosoma Cruzi*, en el recién nacido nos permite detectar si había una infección congénita en los niños de madres seropositivas (17—18).

PROCEDIMIENTOS SEROLOGICOS

Desde la primera aplicación de la reacción de fijación del complemento para el diagnóstico de la infección chagásica por Machado y Guerreiro en el año de 1913 se han aplicado mas de veinte procedimientos diferentes serológicos; y hasta hoy la reacción de fijación del complemento es sin duda el método serológico más aplicado (3—15).

En los últimos años ganó creciente importancia la reacción de hemaglutinación indirecta con glóbulos rojos teñidos, que se destaca por su sensibilidad. (24—25).

La reacción de inmunofluorescencia indirecta, es una reacción indirecta serológica que permite usar como antígeno diferentes estados evolutivos del parásito, es mas tempranamente positiva en la fase reciente de la infección. (6—7).

La reacción de Látex, para aplicar en cualquier laboratorio rural se prefiere, por su sencillez y rapidez.

REACCION DE LATEX

Las pruebas de Látex están siendo empleadas con gran éxito y en amplia medida, tanto para exámenes rápidos cualitativos como para la determinación cuantitativa de títulos séricos.

Se destaca por su exactitud aún en casos agudos de reciente evolución; al igual que en otras reacciones serológicas una serie de factores biológicos de perturbación capaces de limitar el desarrollo de la prueba impiden que el método acierte en un 100%. Así un resultado falso positivo puede ser consecuencia de agregados de globulinas ya existentes en el suero. Igualmente se describe la ausencia de aglutinación hasta ahora no explicada. Por las razones citadas, resultados ambiguos deben ser verificados mediante uno o más métodos serológicos.

Principio de la Reacción.

Consiste en el acoplamiento de antígenos específicos de *Tripanosoma Cruzi* a partículas de polistireno-látex suspendidas. En el caso de haber anticuerpos contra *Tripanosoma Cruzi* en el suero humano, la mezcla con las partículas de látex sensibilizadas conduce a una aglutinación apreciable a simple vista (16 - 20).

Ejecución de la reacción

Una gota de suero a examinar, no calentado ni diluido se coloca a temperatura ambiente sobre la zona delimitada de la lámina de aglutinación. Cada prueba se completa con gotas de suero control.

Agregar una gota del reactivo Latex Chagas bien mezclado. Usando una varilla se mezcla el suero con el reactivo y se extiende sobre una superficie ovalada de mas o menos 2, 5 cm. de diámetro.

Esta mezcla se hace rotar por espacio de 7 minutos, al cabo de los cuales se aprecia macroscópicamente la aglutinación y se compara con la reacción de los sueros de control.

Interpretación

- a) Aglutinación completa.— Todas las partículas de látex forman copos en el borde de la gota, esta reacción es igual a $\begin{smallmatrix} + \\ + \\ + \end{smallmatrix} \begin{smallmatrix} | \\ | \\ | \end{smallmatrix}$, — positiva (como el suero control positivo).
- b) Aglutinación parcial.— Las partículas de látex aglutina en flóculos mas pequeños y no se acumulan en el borde de la gota, esta reacción es igual a $\begin{smallmatrix} + \\ + \\ + \end{smallmatrix}$ positiva, + + positiva, + positiva de acuerdo a la intensidad de aglutinación o floculación.
- c) Ausencia de Aglutinación.— Las partículas de látex confieren a la gota su aspecto lechoso homogéneo, ausencia de reacción igual a negativo como el suero contra negativo).

Fuentes de error

El reactivo de látex debe ser conservado bajo refrigeración, pero éste no debe congelarse. El reactivo debe agitarse bien antes del uso.

Los frascos con reactivo deben volver a cerrarse inmediatamente; la evaporación conduce a la floculación en el reactivo de látex.

El suero no debe ser sustituido por plasma ni por suero inactivado, que no son adecuados para la reacción de látex.

En el caso de haber un título de anticuerpos muy elevado, el exceso de anticuerpos impide la aglutinación. Por esta razón frente a un resultado negativo en casos clínicamente sugestivos, se recomienda repetir la prueba con el suero del paciente diluido 1:2 y 1:4.

REACCION DE FIJACION DEL COMPLEMENTO

Es sin duda el método serológico más aplicado y mejor estudiado, por su sensibilidad y especificidad. Esta fijación del complemento es un test cuantitativo con la determinación de la unidad de complemento a través de una hemólisis de 50% y determinación del título para la enfermedad de chagas. (14—20).

Principio de la Reacción.

Cuando reaccionan antígenos y anticuerpos casi siempre se consumen cantidades estequiométricas del complemento adicionado (c) igual (sistema diagnóstico). Si la cantidad de (c)

agregada es conocida, una vez cumplida esta primera reacción, el resto del complemento no consumido puede establecerse en una segunda reacción.

*Ejecución de la prueba de fijación del complemento.**Micrométodo.*

- a) Goteo de solución BHS (solución de buffer de borato).
- b) Se agrega en el suero del paciente diluido 1:2; así como los sueros de control positivo y negativo.
- c) Al efectuar trasпасos de un reactáculo a los otros se obtiene diluciones de los sueros hasta 1:2048.
- d) Se agrega la solución del antígeno.
- e) Se agrega la solución fría de (c) (complemento).
- f) Se agita bien y se incuba de 15 a 18 horas a 4°C.
- g) Después del periodo de incubación se añade el sistema hemolítico.
- h) Se mezcla profusamente y se incuba por 30 minutos a 37°C.

Lectura de la Reacción.

La lectura de los porcentajes de hemólisis se efectúa visualmente comparando con los estándares colorimétricos de hemólisis.

Se recomienda el siguiente esquema de lectura:

- + - + - + - Hemólisis ausente
- + - + - Hemólisis del 10 al 20%
- + - + - Hemólisis del 30 al 40%
- + - Hemólisis del 50%

Fuentes de error.

Al utilizar complemento y amboceptor incorrectamente almacenados, es decir, fuera del refrigerador se altera considerablemente el resultado.

Se obtienen resultados falsos si los sueros problema son insuficientemente o no inactivados.

Autohemólisis de los eritrocitos de carnero a emplearse en el sistema hemolítico conduce a resultados falsos negativos.

Únicamente el empleo de varillas para microdilución previamente controladas garantizan la obtención de series de dilución impecables.

HEMAGLUTINACIÓN INDIRECTA

Esta técnica se considera un método clásico, casi universalmente aplicable y altamente sensible para la demostración cuantitativa aún de pequeña cantidad de anticuerpos humores. Se la emplea tanto en la investigación como en la rutina diaria del laboratorio.

(8 - - 11).

No obstante constituir un sistema muy sensible, se considera estable y como método cuantitativo poco exigente del punto de vista técnico. A pesar de ello debe señalarse al igual que en otras reacciones serológicas de diagnóstico de la enfermedad de Chagas, el resultado puede perturbarse por factores biológicos inherentes al sistema.

Principio de la Reacción

Antígenos pueden adherirse a la superficie de eritrocitos mediante adsor-

ción inespecífica o fijación covalente. En la subsiguiente reacción con anticuerpos dirigidos contra estos antígenos, la reacción antígeno-anticuerpo provoca una aglutinación de los eritrocitos vectores.

Habitualmente se emplean, para la sensibilización, eritrocitos humanos del grupo "O" o hemáticos de carnero. Frecuentemente el tratamiento de los eritrocitos con soluciones de ácido tánico aumenta su afinidad al antígeno.

Ejecución de la Prueba.

Macrométodo.

Para cada suero a examinar incluyendo los sueros controles se colorea una dilución básica de suero de 1:8 con solución buffer.

- A cada tubo se coloca 0.2ml. de buffer.
- En el primer tubo de cada serie se introducen y se mezclan 0.2ml. del suero diluido 1:8. Al transferir 0.2ml. a los tubos subsiguientes se establece una serie de diluciones hasta 1:8.192.
- A cada tubo se agregan 0.1ml. de Reactivo Chagas para la hemaglutinación indirecta.
- Los tubos son agitados en la gradilla y luego se dejan reposar por espacio de 2 a 3 horas.

Lectura de la Reacción.

La lectura del resultado ha de realizarse por lo menos 2 horas de efectuada la prueba.

Aglutinación completa de las células.

POSITIVO

Aglutinación con formación de un pequeño cúmulo

$1 + a + \frac{1}{2} +$ POSITIVO DEBIL.

Las células sedimentan con

formación de un cúmulo NEGATIVO

Fuentes de error.

La suspensión del reactivo Chagas para la hemaglutinación indirecta ha de efectuarse por lo menos 1 a 2 horas antes de su empleo; hematíes insuficientemente remojados pueden dar un resultado falso positivo.

El reactivo de Chagas puede conservarse en el refrigerador adecuadamente guardado por espacio de 15 días.

PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

La marcación de anticuerpos con colorantes fluorescentes hace posible observar "in vitro" reacciones inmunológicas al microscopio de fluorescencia con luz ultravioleta. (20 — 25)

La técnica de anticuerpos fluorescentes se ha transformado rápidamente de un instrumento de investigación en un método rápido, práctico y sensible de diagnóstico. La información suministrada por los numerosos individuos que han empleado éste método, ha mostrado la versatilidad de su técnica, tanto en investigaciones fundamentales como prácticas.

La técnica de anticuerpos fluorescentes que al principio sólo fue utilizada en la detección de antígenos, ha encon-

trado su más común aplicación en la identificación de anticuerpos circulantes. Este método ya ha encontrado su camino en el laboratorio clínico de rutina y ya ha comenzado a desplazar algunos procedimientos empleados para la detección de anticuerpos en algunas enfermedades tropicales. (6 -24—25).

Principio de la reacción.

La fluorescencia indirecta transcurre en dos fases:

Fase 1.

Se establece el contacto entre el antígeno y el suero problema. Si dicho suero contiene anticuerpos contra *Tripanosoma Cruzi* se produce la unión específica de antígeno y anticuerpo, sin reacción ópticamente reconocible.

Fase 2.

La visualización del complejo antígeno-anticuerpo formado en la fase 1 se logra mediante el agregado de inmunoglobulina anti-humana marcada con fluoresceína que se fija específicamente al complejo antígeno-anticuerpo. El complejo marcado se hace visible a la luz ultravioleta con un microscopio de fluorescencia. Si el anticuerpo específico contra *Tripanosoma cruzi* no se encuentra en el sistema de reacción, no puede lograrse la fijación de la globulina antihumana marcada y por ende no se obtendrá fluorescencia alguna.

Ejecución de la prueba.

Dejar descongelar el porta objetos con antígeno a temperatura ambiente.

Tapar los campos cubiertos de antígeno con las diluciones de antisuero, incubar por 60 minutos a 37°C.

Enjuagar los porta objetos con agua destilada. Lavar 3 veces en solución buffer fosfato.

Cubrir todos los campos con conjugado antihumano; incubar durante 60 minutos a 37°C.

Lavados repetidos con buffer fosfato y enjuague con agua destilada.

Colocar cubre objetos y examinar al microscopio de fluorescencia.

Interpretación de los resultados.

Se registra la intensidad de la fluorescencia de los preparados y se evalúa el resultado de la siguiente manera:

- +++ | ++ Fluorescencia muy intensa
Tripanosomas brillan totalmente.
- ++ | ++ Fluorescencia intensa — Brillo marginal marcado, en parte fluorescencia total de los tripanosomas.
- ++ | + Fluorescencia mediana — Fluorescencia marginal franca de todos los tripanosomas.
- ++ | + Fluorescencia discreta — Débil fluorescencia marginal completa.
- Ninguna fluorescencia = Los tripanosomas se presentan entre rojo parduzcos.

Fuentes de error.

Pocos o ningún tripanosoma a observar; causados por el lavado violento del porta objetos.

Dilución excesiva de la inmunoglobulina antihumana.

Filtros inadecuados.

Consideramos que es importante realizar controles periódicos de laboratorio en nuestros pacientes con enfermedad chagásica crónica, ya que generalmente se les ha instaurado tratamiento quimioterapéutico a base de benznidazol y/o nifurtimox (26). En relación a la técnica de inmunofluorescencia indirecta que investiga anticuerpos antimiocardio, se encontrarán tres patrones morfológicos de depósitos de anticuerpo: sarcoplásmicos (membrano celular), sarcoplásmicos (citoplasmáticos) y fibrilares (bandas Z), encontrándose aparentemente en la miocardiopatía chagásica predominio de los patrones sarcoplásmicos difusos y sarcoplásmicos. (24). Finalmente tenemos una gran interrogación con respecto a las cardiopatías tropicales en el Ecuador, así como de sus peculiaridades inmunológicas, razón por la cual diferentes grupos de investigación de nuestros centros hospitalarios nacionales están trabajando con una casuística mayor y metodología sistematizada, para poder sacar conclusiones prácticas y de apoyo clínico para los médicos ecuatorianos.

RECOMENDACIONES

Visto está que todos los métodos serológicos son de mucha importancia y son sensibles y capaces de detectar con sus reacciones serológicas la enfermedad de Chagas, pero también pudimos observar que todos éstos métodos antes mencionados pueden tener resultados falso positivos unos, falso negativos otros o ambos, por razones ya anteriormente expuestas.

La experiencia en el laboratorio clínico es de efectuar el trabajo en duplicado, usando fundamentalmente el método de látex Chagas, por ser el más sencillo y rápido, alternando con uno de los métodos mas largos, como el de Machino y Guereiro o el de Hemaglutinación Indirecta.

BIBLIOGRAFIA

- Alougal, J., Gasle, G., y Bertin, V.: Tripanosomiasis Chagásica Americana. Anales del Congreso Internacional sobre la enfermedad de Chagas. Río de Janeiro, 1962.
- Neufeld, A., Román, J., et al.: "Nuevos datos sobre la enfermedad de Chagas en Chile". VI Conferencia Panamericana de Directores Nacionales de Salud. Anales del Congreso Internacional sobre la enfermedad de Chagas. Vol. III. Río de Janeiro, 1962.
- Andrade, Z.: "El Hombre: de la infección a la Enfermedad". Coloquio Internacional sobre la enfermedad de Chagas: Aspectos biológicos, socioculturales y control. Abril 1984. Santa Cruz de la Sierra - Bolivia.
- Romero Dávalos, A.: La Enfermedad de Chagas. Edt. Los Amigos del Libro. Santa Cruz, Bolivia. 1978.
- Peñaherrera Jorge: La Enfermedad de Chagas: Presencia del tripanisor en nuestro medio. Trabajo de curso a la Ser. de Med. y Cirugía de Manabí — Ecuador, 1979.
- Pizarro Palma y Anselmi, Alfonso: Miocardiopatía Chagásica. Libro de Medicina Tropical en Homenaje al Dr. Félix Pijuan C. Edt. Poirier. México, 1968.
- Posse, Rubén A., Mouco Graciela y Herrio Néstor: Reunión Internacional sobre la Enfermedad de Chagas. Buenos Aires. Argentina. 1981.
- Bonet, H. A. y Meduery Roberto: Epidemiología de la Enfermedad de Chagas. Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Central de Córdoba. Argentina. 1981.
- Marini Gladys: Avances en el diagnóstico serológico y parasitológico. Reunión Internacional sobre la enfermedad de Chagas. Buenos Aires. 1981.
- González C. León, Galindo Santiago, Peñaherrera Jorge, Harros Oldemar, Merino Fabián, Lazo Alberto, Alenciz Arturo y Benítez Jaime: "Miocardiopatía Chagásica Crónica en el Ecuador. Resúmenes del IX Congreso Sudamericano de Cardiología. Caracas — Venezuela. 1981".
- Suárez R. Raúl: La Enfermedad de Chagas y su diagnóstico serológico en el laboratorio de la Fuerza Aérea Boliviana. Reunión Internacional MEDFIA. La Paz Bolivia. 1981.
- González C. León, León L., Galindo, S., y Peñaherrera, J.: "Chronic Chagasic Cardiomyopathy in Ecuador. Immunology: Aspects". X World Congress of Cardiology. Washington, DC, USA, Sept. 1986.
- Cossio, F.: "Estado actual de nuestros conocimientos sobre la miocarditis chagásica". Revista Médica del Norte. Tucumán Argentina. 1970.
- Alvarez, Julio C.: "Los tres culos de la medicina tropical ecuatoriana". Historia de la Medicina Tropical Ecuatoriana. Tomo II. Edt. Arquidiocesana. Guayaquil — Ecuador. 1981.
- Astudillo E. Cefin, y Astudillo A. Fernando: Clínica Parasitológica: Tripanosomiasis.

- ma Cruz: *Enfermedad de Chagas*. Facultad de Medicina. Universidad Central del Ecuador. 1985.
- 15 Neiro P. Octavio y Pinus Neira Gladys: "La Enfermedad de Chagas y Tripanosomina Cruz". Tratado de Parasitología Médica. Edit. EMN. Cuenca — Ecuador. 1982.
 - 17 Lora Ronán: "Enfermedades Parasitarias como problema de Salud Pública". VII Congreso Latinoamericano de Parasitología y III Congreso Nacional de Medicina Tropical y Parasitológica. Guayaquil — Ecuador. Oct. 1985.
 - 18 Anselmi, A. y Molino, P.: La Enfermedad de Chagas y la Miocardiopatía Chagásica. Arch. Inst. Cardiológ. Mex. 42:622 — 28. 1972. México.
 - 19 Gofredo, Santiago: Miocardiopatía Chagásica en Guayaquil. Ecuador. Estudio Epidemiológico Clínico. Actas del III Congreso Nacional de Cardiología. Quito — Ecuador. 1978.
 - 20 León, Luis A.: Enfermedad de Chagas. Tres consideraciones del problema en la República del Ecuador. Actas del V Congreso Nacional. Pág. 224-234. Edit. Casa de la Cultura Ecuatoriana. Quito. 1982.
 - 21 Rosenbaum, M. O.: Chagasic Myocardiopathy. Progr. Cardio. Dis. 7:109-223 USA. 1964.
 - 22 Daquin, A. C., Lazdu, R., y Furman, B.: Cardiopatía Chagásica Crónica. Rev. Medicina. Buenos Aires — Argentina. 12. 123-148. 1962.
 - 23 Suez Málaga G., González, M. W., y Revilla, L. A.: "Miocardiopatía Chagásica Crónica". Rev. Peruana de Cardiología. Lima. 1975.
 - 24 Vivar, N., Barrio, S., Chacón, C., Dorja, J., Ayala, M., Sumbá, C., Paredes, Y.: Anticuerpo Antimiocardi y Enfermedad Cardíaca. Boletín Ecuatoriano de Cardiología. Vol. 3 Nº 2. Quito, 1982.
 - 25 Shaper, A. C. et al.: Immunological studies in endomyocardial fibrosis and other forms of heart disease in the tropics. Prel. Com. Lancet. 1:598. 1967. Inglaterra.
 - 26 Luis de Abreu, J., Rodríguez Coura, J.: Experiencia terapéutica con benznidazol e con nifurtimox en pacientes na forma crónica da doença de Chagas. Apresentada al XIII Congr. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical y IIº Congr. Sociedade Brasileira de Parasitologia. Brasília. Brasil. Feb. 1977. pág. 35. Soc. Bras. Med. Trop., Tropical, Brasil 1877.