

Investigaciones sobre enfermedad de Chagas en Costa Rica por la reacción de fijación del complemento *

por

Angeles Berríos * *

(Recibido para su publicación el 6 de setiembre de 1960)

En 1952 ZELEDÓN (28) practicó las primeras reacciones de fijación del complemento para el diagnóstico de enfermedad de Chagas entre nosotros. El trabajo lo realizó en niños escolares de 3 zonas con triatomas (*T. dimidiata*) y de una en donde el vector es desconocido. De 317 reacciones de las zonas endémicas obtiene 5,6 por ciento de positividad y de 90 de la otra zona únicamente 1,1 por ciento. Tomando en cuenta éstos antecedentes podemos suponer la existencia en Costa Rica de cierto porcentaje de enfermos chagásicos que no son descubiertos clínicamente y evolucionan hacia un estado crónico o "indeterminado" como sucede en otros países del Continente.

El valor diagnóstico de la reacción de fijación del complemento para descubrir los casos crónicos de la enfermedad de Chagas ha sido tema de numerosas publicaciones desde el trabajo de GUERREIRO y MACHADO en 1913 (9), quienes aplicaron por primera vez la reacción de Bordet-Gengou en el diagnóstico de esta tripanosomiasis.

Durante muchos años se tuvo como gran inconveniente la obtención y preparación del antígeno hasta que KELSER (12) introdujo un antígeno preparado a partir de formas de cultivos de *Schizotrypanum cruzi* que posteriormente fue mejorado por DAVIS (5) quien preparó antígenos preservados con mertiolato, suficientemente estables, específicos y no anticomplementarios. FREITAS y ALMEIDA (7) en 1949 describen un nuevo tipo de antígeno extraído con benceno, en el cual se reduce al mínimo la capacidad anticomplementaria,

* Este trabajo fué realizado en los laboratorios del Hospital San Juan de Dios y de la Universidad de Costa Rica y representa un extracto de la Tesis de Grado del mismo nombre presentada a la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica.

** Departamento de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

estando por otro lado dotado de una estabilidad mayor y de gran capacidad fijadora específica.

Un buen número de investigadores ha seguido la técnica de Kolmer con diferentes modificaciones, habiendo por lo tanto con este método cierta variación de criterio en cuanto al grado de intensidad de las reacciones consideradas como positivas. FREITAS (6) en 1951 aplicó la técnica cuantitativa de Wadsworth *et al.*, que utiliza el principio del 50 por ciento de hemólisis para la dosificación del complemento y empleó el antígeno descrito en colaboración con ALMEIDA (l. c.). FREITAS explica la importancia de usar esta técnica, ya que permite tener un mayor control sobre los reactivos y posee mayor sensibilidad.

Actualmente la reacción de fijación del complemento para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas ha tomado mayor importancia, ya que diversos investigadores la aplican en individuos no seleccionados, para diagnosticar los casos en la fase crónica. Además, ha adquirido gran valor en la selección de donadores de sangre, desde que FREITAS *et al.* (8) y NUSSENZWEIG *et al.* (19) reportaron los primeros casos de transmisión de la enfermedad por transfusión sanguínea.

Con el fin de conocer hasta qué punto tendría valor entre nosotros el practicar rutinariamente la reacción de GUERREIRO y MACHADO en pacientes del Hospital San Juan de Dios y principalmente en donadores de sangre que, aparentemente sanos, pueden ser portadores y transmisores de la tripanosomiasis, realizamos este trabajo con sueros de individuos sin seleccionar, que llegan al Laboratorio Bacteriológico del mencionado Hospital. Con los datos aquí presentados esperamos poner en evidencia la importancia que tiene la enfermedad de Chagas en el país y el problema que representan los donadores de sangre con reacción de fijación del complemento positiva.

MATERIAL Y METODOS

REACCIÓN CUALITATIVA

Para ésta reacción se siguió en términos generales la técnica de KOLMER (13), usándose un volumen final de 1,5 ml por tubo, incluyendo siempre tubos controles de suero y sueros conocidos positivos y negativos.

SISTEMA HEMOLITICO. El sistema hemolítico se preparó mezclando 0,25 ml de una dilución 1/600 de hemolisina conteniendo dos unidades hemolíticas, con una cantidad igual de suspensión de glóbulos rojos de carnero al 2 por ciento.

COMPLEMENTO. Se usó complemento liofilizado Sclavo (Instituto Sieroterápico e Vaccinogeno Toscano, Italia). Después de restablecido el volumen se diluyó con solución salina helada y se mantuvo siempre en baño de hielo. Se usaron en la reacción 0,2 ml de una dilución 1/10, cantidad que corresponde en nuestro caso a dos unidades 100 por ciento de hemólisis.

ANTÍGENO. El antígeno se preparó con la cepa D-1 de *S. cruzi* del Hospital San Juan de Dios, cedida por el Dr. Alfonso Trejos. Los flagelados se

cultivaron en el medio N. N. N. con ligera modificación (28) obteniéndose un buen rendimiento en la obtención del antígeno. Los flagelados fueron cosechados y tratados según la técnica de Johnson descrita por ZELEDÓN (28). El antígeno se conservó congelado y resultó estar dotado de un buen poder fijador específico y desprovisto de poder anticomplementario, hemolítico y fijador inespecífico. La dosis óptima de antígeno correspondió a 0,2 ml de una dilución 1/40.

SUEROS. El trabajo se realizó con sueros de pacientes del Hospital San Juan de Dios, que son enviados al Laboratorio Bacteriológico para serles practicada la reacción de V. D. R. L. Una vez recogidos los sueros se tomaron datos de los pacientes así: edad, padecimiento, residencia y resultado de la reacción de V. D. R. L.

En total se estudiaron 1000 sueros, la mayoría de personas adultas, entre los que se incluyeron 221 de donadores de sangre, del mismo Hospital y 73 de enfermos mentales del Asilo Chapuí. El trabajo se hizo en sueros relativamente frescos, guardados en congelador por un tiempo máximo de tres días. Además, se incluyeron sueros de 5 casos de enfermedad de Chagas comprobada varios años antes por demostración del parásito, 4 sueros de casos de leishmaniasis tegumentaria, uno de un caso activo y los otros de casos antiguos curados, y 10 sueros de personas aparentemente normales.

REACCIÓN CUANTITATIVA

Se usó la solución buffer de barbituratos de KABAT y MAYER (11) para diluir todos los reactivos empleados en ésta técnica. Para titular los sueros se siguió la técnica descrita por FREITAS (6), el volumen final se modificó a 1,5 ml y se emplearon cubetas de 12 mm del Espectrofotómetro Coleman Junior. Además, los glóbulos se estandarizaron para hacer lecturas colorimétricas con ese volumen, así como también los otros reactivos.

En la determinación de los títulos se siguió el método de dilución del suero usando siempre 3 unidades de complemento. Se incluyeron controles de todos los reactivos y de sueros positivos y negativos.

SISTEMA HEMOLÍTICO. El sistema hemolítico fue preparado mezclando partes iguales de una suspensión de glóbulos de carnero estandarizada a 10^9 células por ml según la técnica descrita por KABAT y MAYER (11), y una dilución 1/250 de hemolisina conteniendo dos unidades hemolíticas en 0,1 ml. Las lecturas se hicieron en el Espectrofotómetro Coleman Junior usando cubetas de 19 y 12 mm y longitud de onda de 540 $m\mu$, correspondiendo las densidades ópticas a 0,75 y 0,47 respectivamente. Se leyeron diferentes concentraciones de hemoglobina comprendiendo diversos grados de hemólisis.

COMPLEMENTO. El complemento se tituló al 50 por ciento de hemólisis, según la técnica descrita por KABAT y MAYER (11), usando el mismo complemento liofilizado Sclavo. Se prefirió preincubar el complemento por una hora y media, en vez de una hora; luego se adicionó el sistema hemolítico incubándose de nuevo una hora, siendo estos los tiempos de incubación usados en la

reacción final, no introduciéndose, por lo tanto, ninguna corrección a la unidad 50 por ciento. El número de unidades encontradas fué de 125 por mililitro; para la reacción una unidad 50 por ciento correspondió a 0,04 ml de una dilución 1/25.

ANTÍGENO. Se usó el antígeno de FREITAS y ALMEIDA (7) empleando temperaturas de -10°C para la extracción. Los cultivos fueron hechos en medio "Leventhal-Eugon-Broth" empleado para *Hemophilus influenzae* y adaptado por Warren para el *S. cruzi*, según ZELEDÓN (30). Empleamos para la preparación del medio, sangre de vacunos al 15 por ciento en vez de sangre de carnero y filtramos en un filtro Buchner con una capa de algodón y otra de asbestos con la ayuda de una bomba de vacío.

El antígeno se encontró desprovisto de poder anticomplementario y hemolítico, siendo muy específico y de un alto poder fijador. Se conservó congelado a -10°C y la dosis óptima a usar fué de 0,1 ml de una dilución 1/20.

SUEROS. Se usaron los sueros que dieron fijación de 2, 3 y 4 cruces en la reacción cualitativa los cuales fueron guardados congelados por un lapso de 4 a 5 meses. Se incluyeron también los sueros positivos de los 5 casos de enfermedad de Chagas, los de leishmaniasis y los normales mencionados en la técnica cualitativa.

RESULTADOS

RESULTADOS OBTENIDOS CON LA REACCIÓN CUALITATIVA. Se consideraron positivos los sueros que dieron fijación de 3 y 4 cruces y como dudosos los que mostraron inhibición de hemólisis correspondiente a 2 cruces. En el Cuadro 1 se analizan los casos positivos y dudosos de acuerdo con su procedencia.

De todos los sueros estudiados sólo se encontraron dos con poder anticomplementario. De los 5 casos con diagnóstico parasitológico de enfermedad de Chagas se obtuvieron tres reacciones de 4 cruces y dos de 3 cruces. De los 4 sueros de leishmaniasis sólo uno fué positivo con reacción de 4 cruces, los sueros controles de personas aparentemente sanas fueron siempre negativos.

RESULTADOS OBTENIDOS CON LA REACCIÓN CUANTITATIVA. Se estudiaron los 90 sueros seleccionados en la prueba cualitativa. Para clasificarlos se siguió el criterio de FREITAS (6) que considera positivos títulos mayores de 1,9 y dudosos títulos entre 1,5 y 1,9, siendo negativos los sueros que dan una hemólisis mayor del 90 por ciento. En el Cuadro 2 se distribuyen los casos positivos por esta técnica, asumiendo que los casos negativos por la reacción cualitativa son negativos por la técnica de FREITAS. En el Cuadro 3 se analiza la frecuencia de los títulos superiores a 2,0.

Se llegó a determinar que las reacciones de 3 y 4 cruces encontradas en la prueba cualitativa dan títulos mayores o iguales a 2,0. De los 61 considerados como positivos con esa prueba se titularon sólo 59, ya que un suero resultó anticomplementario para esta técnica y del otro no se tuvo suficiente cantidad. De los 29 sueros dudosos por la técnica cualitativa 7 mostraron he-

CUADRO 1

*Distribución de los casos positivos
por la técnica de Kolmer*

Procedencia	Nº de reacciones	Positivos (3 y 4+)	Dudosos (2+)	Porcentaje de positivos
Pacientes del Hospital San Juan de Dios	706	39	20	5,52
Donadores de sangre	221	16	4	7,24
Enfermos del Asilo Chapuí	73	6	5	8,22
Totales	1000	61	29	6,10

CUADRO 2

Distribución de los casos positivos por la técnica de Freitas considerándose como negativos los sueros que dieron fijación de menos de 2 cruces por la técnica de Kolmer. Véase texto para los detalles

Procedencia	Nº de Sueros	Positivos	Porcentaje de positivos
Pacientes del Hospital San Juan de Dios	706	41	5,80
Donadores de sangre	221	17	7,69
Enfermos del Asilo Chapuí	73	7	9,58
Totales	1000	65	6,50

mólisis mayor del 90 por ciento, 17 dieron títulos entre 1,7 y 1,9, 4 dieron títulos mayores de 1,9 y 1 no se tituló por falta de suero.

Todos los 5 casos parasitológicamente comprobados de enfermedad de Chagas usados como testigos dieron títulos mayores de 2,0. De los pacientes con leishmaniasis 3 presentaron títulos menores de 1,5 y el de reacción de 4

CUADRO 3

*Distribución de frecuencia de los
títulos mayores de 2,0*

Título	Frecuencia
2,00 — 2,49	39
2,50 — 2,99	16
3,00 — 3,49	4
3,50 — 3,99	1
4,00 — 4,49	1
4,50 — 5,00	2

cruces en la prueba cualitativa, dió un título de 3,0. En éste caso se logró determinar la posible existencia de ambas enfermedades, ya que la paciente relata haber residido en casa con triatomas.

De los 41 pacientes del Hospital San Juan de Dios que dieron reacción positiva sólo se obtuvieron datos epidemiológicos de 35; casi todas las respuestas fueron afirmativas en cuanto a la existencia del agente vector en las respectivas habitaciones. De los catalogados como dudosos 8 aceptaron haber encontrado triatomas en sus casas.

Uno de los casos positivos resultó ser un niño recién nacido que mostró una reacción cualitativa de 3 cruces y un título por la técnica de FREITAS de 2,28 sin que se pudiera obtener ningún dato personal de la familia, por haber el niño abandonado el Hospital. Para los donadores de sangre y enfermos del Asilo Chapuí con reacciones positivas no se logró ninguna información sobre el conocimiento que tenían del transmisor.

La comparación estadística de los porcentajes de positividad según su procedencia (Cuadros 1 y 2), para cada técnica por separado, muestra que las diferencias no son significativas ($p < 0,01$). El porcentaje promedio final de positividad obtenido por las dos técnicas usadas fue de 6,5.

Como se dijo anteriormente a todos los sueros se les tomó el resultado de la reacción de V. D. R. L. y de entre los 1000, 43 arrojaron resultado positivo, algunos con títulos altos, para esta reacción. Sólo un suero de estos dió resultado positivo por enfermedad de Chagas y otro se mostró dudoso, refiriendo ambos pacientes la existencia de triatomas en sus casas.

DISCUSION

El porcentaje de positividad obtenido por ZELEDÓN (28) con la técnica cualitativa es bastante menor que el nuestro si tomamos en cuenta que aquel autor consideró como positivas las reacciones de 2 cruces. Si tal no hubiere sido, el porcentaje de ZELEDÓN habría bajado a aproximadamente 2,5 para la zona endémica aunque no podríamos considerar esta cifra como definitiva, toda vez que sabemos que algunas de las reacciones de 2 cruces pueden corresponder a casos de infección chagásica. Una explicación posible entre las diferencias de las cifras de ZELEDÓN y las nuestras es que aquel autor escogió grupos de individuos de poca edad (escolares) en los cuales ha habido menos probabilidades de infección o reinfección y por consiguiente bien podría pensarse en la posibilidad de una predominancia de casos leves con tenores de anticuerpos bajos en individuos jóvenes. El trabajo que aquí se presenta se hizo en individuos de todas las edades, siendo la mayoría personas adultas y en todo caso se pudo observar la baja frecuencia con que aparecen las reacciones positivas intensas (4 cruces) ya que sólo en 11 oportunidades se obtuvo ese grado de positividad. Este dato está relacionado con la intensidad de las reacciones positivas encontradas por ZELEDÓN (l. c.).

En Brasil, BRENER (2) obtiene 31,62 por ciento de positividad en pacientes de clínicas particulares del Estado de Minas Gerais; CARVALHAL *et. al.* (3) en el Municipio de São Caetano 7,8 por ciento y PORTUGAL *et. al.* (25) en el Municipio de Itaporanga 46,67 por ciento de positivos por la reacción de fijación del complemento. En la Argentina, TORRICO (26) encuentra en pacientes cardíacos crónicos 37,5 por ciento de positivos.

En Chile, NEGhme y ROMÁN (15) obtienen 17 por ciento de positividad en habitantes de zonas rurales. En Venezuela, MAEKELT (14) en pacientes del Hospital Central de Valencia obtiene 25 por ciento de positivos en un grupo, y en otro encuentra 34 por ciento de positividad siempre con la misma reacción de fijación del complemento. Estos datos parecen indicar que, en general, los porcentajes de positividad en América del Sur, en poblaciones no seleccionadas, son bastante más altos que los obtenidos por nosotros.

En nuestro caso de 59 sueros positivos (3 y 4 cruces) titulados con la técnica cuantitativa se encontró que todos presentaron título mayor de 2,0, lo que nos indica una concordancia absoluta entre las dos pruebas. De los considerados como dudosos por la técnica de KOLMER (2 cruces) se titularon 28 sueros: 4 dieron título mayor de 2,0, 7 presentaron reacción negativa y el resto quedó incluido entre las reacciones dudosas por la técnica de FREITAS. (1,5 a 1,9). UVO *et al.* (27) hacen un estudio comparativo entre las técnicas cualitativa de Muniz y cuantitativa de Freitas. Obtienen que las reacciones positivas por esta última técnica son siempre positivas por la técnica de Muniz, mientras que reacciones dudosas o negativas por la técnica de Freitas arrojaron resultados desde negativos hasta positivos débiles (1 y 2 cruces) por la técnica cualitativa. También en nuestros resultados se puede observar el mayor grado de especificidad que presenta la prueba cuantitativa con respecto a la cualitativa, puesto que nos

permite agrupar mejor los casos considerados como dudosos en la prueba de KOLMER.

FREITAS (6) indica que los títulos positivos oscilan entre 2,0 y 10,0 siendo raros los títulos mayores. De 70 sueros positivos obtiene sólo 12 con títulos entre 2,0 y 3,0 y el resto con títulos mayores de esas cifras. Señala no haber encontrado ninguna relación entre la gravedad de la enfermedad y el título, ya que formas cardíacas graves presentaron tanto títulos altos como bajos. En nuestros casos positivos se observó que la mayoría de los sueros dieron títulos relativamente bajos (2,0 a 3,0) y el valor más alto fué de 4,7 el cual se obtuvo sólo en dos casos. Estos resultados están en concordancia con la intensidad de las reacciones obtenidas con la prueba cualitativa y nos confirma el bajo tenor de anticuerpos observado en nuestros casos de tripanosomiasis. Quizás la baja respuesta humoral entre nuestros chagásicos guarde alguna relación con la poca frecuencia con que pueden presentarse reinfecciones, ya que ZELEDÓN (31) refiere que el número de vectores capturados en las habitaciones es siempre pequeño en comparación a lo que ocurre en otros países de América del Sur. MAEKELT (14) en Venezuela detalla los títulos de 68 sueros positivos y aunque sólo en dos casos obtiene títulos mayores de 3,5 siempre resultan, en general, más altos que los encontrados por nosotros.

En los 5 casos de enfermedad de Chagas que habían sido diagnosticados por la presencia del parásito y usados por nosotros como controles positivos, se obtuvieron reacciones de 3 y 4 cruces con la prueba cualitativa y títulos entre 2,0 y 3,0 con la técnica de FREITAS. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en los otros sueros. De los 4 casos de leishmaniasis sólo se encontró un suero positivo con ambas técnicas, probablemente debido a la coexistencia de las dos enfermedades. Además, no se encontró ningún falso positivo en 43 sueros de posibles sifilíticos examinados.

La especificidad y sensibilidad de la reacción de fijación del complemento ha sido motivo de muchos trabajos; recientemente FREITAS (6) y PELLEGRINO y BRENER (23) afirman que la reacción de fijación del complemento con antígeno de cultivos de *S. cruzi* se comporta como negativa o dudosa en casos de leishmaniasis y que una reacción positiva en éstos casos indica una infección concomitante y no una reacción de grupo. MAEKELT (14) practica la reacción con antígeno de *S. cruzi* en casos de leishmaniasis tegumentaria y de infección por *Trypanosoma rangeli* y no obtiene ningún resultado positivo. CHAFFEE *et al.* (4) que obtienen reacciones cruzadas entre enfermedad de Chagas y leishmaniasis atribuyen esta divergencia a los métodos usados.

Como ya quedó mencionado, entre nuestras reacciones positivas está el suero de un niño recién nacido, lo que nos hace pensar en el posible pasaje de anticuerpos de la madre a través de la placenta. MAEKELT (14) logró comprobar esta transmisión de anticuerpos en 12 casos y sólo en uno de ellos pudo examinar la sangre de la madre que también dió reacción positiva. En estos casos es necesario pensar asimismo en la posibilidad de una infección chagásica congénita (10).

Las reacciones positivas obtenidas por nosotros están distribuídas en to-

das las provincias del país, correspondiendo este dato con la presencia del vector en los mismos lugares (29) y coincidiendo asimismo con la distribución de los 25 casos de enfermedad de Chagas ya comprobados en el país (31).

De los 221 sueros de donadores de sangre examinados, se obtuvieron 17 positivos (7,69%) lo cual señala un problema entre nosotros por la posible transmisión de la enfermedad de Chagas por transfusión de sangre. Este punto ha tomado mayor importancia desde que FREITAS *et al.* (8) dieron a conocer los dos primeros casos de transmisión de la enfermedad por éste medio en Brasil. Posteriormente NUSSENZWEIG *et al.* (19) encuentran otro caso positivo y uno probable entre el grupo de receptores que habían sido observados por FREITAS *et al.* (1. c.).

En Brasil, PELLEGRINO (22) encuentra de 179 donadores examinados, de un Hospital de Belo Horizonte, 3 casos positivos por reacción de fijación del complemento y 2 dudosos. Posteriormente PELLEGRINO *et al.* (24) reportan 14 casos positivos y 6 dudosos de un grupo de 576 donadores; también BIANCALANA *et al.* (1) obtienen 19,1 por ciento de positividad en 233 donadores de Minas Geräis. FREITAS *et al.* (8) encuentran 35 reacciones positivas de 1623 donadores de Hospitales de São Paulo, Brasil, examinados por la técnica de Freitas; en el mismo país PASSALACQUA *et al.* (21) obtienen 4,1 por ciento de positivos y NUSSENZWEIG *et al.* (19) encuentran 1,7 por ciento. Los investigadores brasileños relacionan los porcentajes de positividad con las zonas endémicas de la enfermedad. En Venezuela, MAEKELT (14) de 449 donadores examinados obtiene 12 por ciento de positivos, por lo que indica la necesidad de practicar la reacción de fijación del complemento en la selección de donadores de sangre.

En nuestro caso el problema amerita atención, sí se toma en cuenta que la mayoría de los donadores que acuden al Hospital san Juan de Dios, son de la provincia de San José y que en el grupo aquí estudiado (149), se encontró 14 casos en reacción positiva. Esto nos hace pensar en la existencia de un buen número de portadores aparentemente sanos, que como bien dice ZELEDÓN (29) "juegan un papel epidemiológico importante", mayor aún si estas personas son admitidas como donadores de sangre.

NUSSENZWEIG *et al.* (18) por inoculación a ratones demostraron que la refrigeración de la sangre no mata a los tripanosomas. Varios compuestos químicos y antibióticos han sido empleados para esterilizar las sangres que se usan en transfusiones. NUSSENZWEIG *et al.* (17) han estudiado la acción de los colorantes trifenil-metánicos, violeta de genciana y cristal violeta, encontrando resultados más satisfactorios con el primero en diluciones de 1/4000, obteniendo la muerte de los flagelados después de 24 horas, tornando así la sangre apta para la transfusión. NETO y MELLONE (16) en 1959 hicieron transfusión de sangre de un caso agudo de enfermedad de Chagas, en un receptor voluntario, adicionando violeta de gencina (0,5 gm /l) 48 horas antes de la transfusión, y no observaron transmisión de la enfermedad. En el mismo año NUSSENZWEIG *et al.* (20) agregan violeta de genciana en igual concentración a 18 sangres de donadores con reacción de fijación del complemento positiva.

Estos autores dejaron actuar el colorante durante 24 horas y después de repetidos exámenes en los 18 receptores no encontraron ningún caso que contrajera la enfermedad. En vista de éstos resultados aconsejan el uso de rutina del colorante en los Bancos de Sangre para tratar aquellas sangres con reacción de fijación del complemento positiva para enfermedad de Chagas.

La importancia de donadores con reacción de fijación del complemento positiva debe siempre tenerse en mente máxime que PELLEGRINO *et al.* (24) pudieron demostrar que 3 donadores estudiados continuaban presentando xenodiagnósticos positivos varios años después de alejados de las zonas endémicas. Estamos de acuerdo con PELLEGRINO (22), al afirmar que la transfusión de sangre de donadores con reacción de fijación del complemento positiva constituye un serio peligro si tomamos en cuenta el volumen de sangre que se usa en comparación al empleado en xenodiagnósticos, hemocultivos o inoculación a animales.

AGRADECIMIENTO

La autora quiere dejar constancia de su más profundo agradecimiento al Dr. Rodrigo Zeledón por sus constantes consejos, eficiente colaboración siempre que fue necesario y por facilitarle toda la bibliografía revisada. Además, su reconocimiento al Dr. Alfonso Trejos W. por las valiosas indicaciones y facilidades prestadas, lo mismo que, al personal del Laboratorio Bacteriológico y Banco de Sangre del Hospital San Juan de Dios.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se practica la reacción de fijación del complemento para enfermedad de Chagas en 1000 sueros a saber: 706 de pacientes del Hospital San Juan de Dios, 221 de donadores de sangre del mismo Hospital y 73 del Asilo Chapuí para dementes.

Los sueros fueron sometidos primero a la técnica cualitativa de Kolmer ligeramente modificada, usando formas de cultivo de *S. cruzi* como antígeno. En los positivos (3 y 4 cruces) y dudosos (2 cruces), obtenidos por esta reacción, se practicó luego la reacción por la técnica cuantitativa de Freitas usando el 50 por ciento de hemólisis como punto de referencia. Como controles de ambas técnicas fueron usados 5 sueros de casos antiguos de enfermedad de Chagas comprobados parasitológicamente, 4 casos de leishmaniasis cutánea y 10 sueros de personas aparentemente normales.

Por la técnica de Kolmer se obtuvieron los siguientes resultados: 61 positivos (3 y 4 cruces) correspondiendo 39 a pacientes del Hospital San Juan de Dios, 16 a donadores de sangre y 6 al Asilo Chapuí, y 29 dudosos (2 cruces). Los controles de casos de triponosomiasis presentaron reacciones de 3 y 4 cruces y de los casos de leishmaniasis sólo un suero reaccionó positiva-

mente habiéndose observado que la paciente habitaba casa con triatomas.

Los resultados obtenidos con la técnica de Freitas se detallan así: de 59 positivos por la técnica de Kolmer todos mostraron títulos mayores de 2,0; de 28 dudosos por la misma técnica 4 presentaron títulos mayores de 2,0, 7 reaccionaron negativamente y 17 quedaron como dudosos (1,5 a 1,9). Los positivos por la técnica de Freitas están distribuidos así: 41 del Hospital San Juan de Dios, 17 de donadores de sangre y 7 del Asilo Chapuí. Los casos de tripanosomiasis usados como controles dieron títulos mayores de 2,0 y el caso de leishmaniasis positivo con la prueba cualitativa, dio un título de 3,0.

Se hace un análisis estadístico comparativo de los porcentajes obtenidos en el Hospital San Juan de Dios, donadores de sangre y Asilo Chapuí por ambas técnicas, y se encuentra que las diferencias no son significativas en ninguno de los casos.

Se comparan los resultados obtenidos con las dos técnicas encontrándose una concordancia absoluta entre las reacciones positivas, aunque no entre las dudosas (2 cruces), por lo que se afirma que la técnica de Freitas ofrece mayor especificidad que la técnica de Kolmer. El porcentaje final promedio de positivos, sobre los 1000 sueros, obtenido con ambas pruebas es de 6,5.

Se discute la baja frecuencia con que se obtuvieron las reacciones de 4 cruces en la prueba cualitativa y los títulos mayores de 3,0 con la técnica cuantitativa, haciendo comparaciones y comentarios con los títulos obtenidos por otros investigadores. Se atribuyen nuestros resultados a un bajo tenor de anticuerpos en los casos costarricenses de tripanosomiasis.

Se hace resaltar la especificidad de la prueba cualitativa al no obtener ningún resultado positivo falso en 43 sueros con reacción de V.D.R.L. positiva.

Se menciona la posibilidad de transmisión de anticuerpos a través de la placenta, debido al caso de un niño recién nacido con reacción de fijación del complemento positiva.

Por último se indica el peligro que constituyen los donadores de sangre con reacción de fijación del complemento positiva (7,69%), por la posible transmisión de la enfermedad durante la transfusión, y se menciona la posibilidad de obtener una esterilización completa de la sangre con violeta de genciana según trabajos de otros investigadores.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

Complement fixation test for Chagas disease were carried out on 1,000 sera as follows: 706 from Hospital San Juan de Dios patients, 221 from blood donors of the same Hospital, and 73 from patients of Asilo Chapuí for the insane.

The sera were first studied employing a slight modification of Kolmer's qualitative technique, in which culture forms of *S. cruzi* were used as the antigen. Positive (3 and 4 plus) and doubtful (2 plus) sera thus obtained were analyzed

by the Freitas technique, using 50 per cent hemolysis as the reference point. As controls for both techniques, sera from 5 old cases of Chagas disease diagnosed parasitologically, from 4 cases of cutaneous leishmaniasis, and from 10 apparently healthy persons were employed.

Using Kolmer's technique the following results were obtained: 61 positives (3 and 4 plus), corresponding 39 to patients of Hospital San Juan de Dios, 16 to blood donors, and 6 to Asilo Chapuí patients; in addition, 29 doubtful (2 plus) sera were encountered. The controls of trypanosomiasis cases gave reactions of 3 and 4 plus, and of those of the leishmaniasis cases only one serum gave a positive reaction (corresponding to a patient living a house where triatomid bugs were to be found).

The results obtained by the Freitas technique were as follows: out of 59 positive sera by the Kolmer technique all gave titers higher than 2.0; out of 28 doubtful cases using the same technique, 4 gave titers higher than 2.0, 7 gave a negative reaction, and 17 remained as doubtful (1.5 to 1.9). The positive cases as per the Freitas technique were as follows: 41 from Hospital San Juan de Dios, 17 from blood donors, and 7 from Asilo Chapuí. The trypanosomiasis cases used as controls gave titers higher than 2.0, and the qualitative test positive leishmaniasis case gave a titer of 3.0.

A comparative statistical analysis was made of the percentages obtained in cases from Hospital San Juan de Dios, blood donors, and Asilo Chapuí using both techniques, and it was found that no significant differences resulted.

The results obtained by both techniques are compared, and a perfect agreement is found among the positive reactions, although not among the doubtful ones (2 plus); hence it is concluded that the Freitas technique is more specific than the Kolmer technique. The final average positive percentage on 1000 sera using both techniques is 6.5.

The low frequency of 4 plus reactions obtained with qualitative technique are discussed, comparing them with the titers obtained by other researchers. Our results are attributed to the low antibody content in the sera of Costa Rican Chagas disease cases.

The specificity of the qualitative test is commended since no single false positive test was obtained among 43 V. D. R. L. positive sera.

The possibility of transplacental passage of antibodies is mentioned in view of a case a newborn giving a positive complement fixation test.

Lastly, the danger constituted by complement fixation test positive blood donors (7.69 per cent) is pointed out in regards to the possible transmission of the disease during transfusion; mentioned is made in this regard to the possibility of obtaining complete sterilization of the blood by means of gentian violet, according to the publications of other authors.

BIBLIOGRAFIA

1. BIANCALANA, A., J. L. DE FREITAS, V. A. NETO, V. NUSSENZWEIG & R. SONNTAG.
1953. Investigações serológicas sobre doença de Chagas entre candidatas a doadores em Bancos de Sangue nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. *O Hospital*, 44(6):745-749.
2. BRENER, Z.
1953. Dados sobre a reação de fixação do complemento no diagnóstico da doença de Chagas. *O Hospital*, 43(6):777-780.
3. CARVALHAL, S., A. FERRACCI, A. JOUMES, O. PILAGALO, D. UVO & A. AGUIAR.
1954. Estudos sobre a moléstia de Chagas numa coletividade operaria no Município de S. Cêetano do Sul, Estado de Sao Paulo. (Considerações clínicas e epidemiológicas). *Fol. Clin. et Biol.*, 22(1-2):9-22.
4. CHAFFEE, E. F., E. H. FIFE JR. & J. F. KENT
1956. Diagnosis of *Trypanosoma cruzi*, infection by complement fixation. *Amer. Jour. Trop. Med. Hyg.*, 5(5):763-771.
5. DAVIS, D. J.
1943. An improved antigen for complement fixation in american trypanosomiasis. *Publ. Health Rep.*, 58:775-777.
6. FREITAS, J. L. P. DE
1951. Reação de fixação do complemento para diagnóstico da moléstia de Chagas pela técnica quantitativa. *Arq. Hig. Saúde Publ.*, 16(48):55-94.
7. FREITAS, J. L. P. DE & J. O. ALMEIDA
1949. Nova técnica de fixação do complemento para moléstia de Chagas *O Hospital*, 35(6):787-800.
8. FREITAS, J. L. P. DE, A. BIANCALANA, V. A. NETO, V. NUSSENZWEIG, R. SONNTAG & J. G. BARRETTO.
1952. Moléstia de Chagas em Bancos de Sangue na capital de São Paulo. *O Hospital*, 41(2):229-236.
9. GUERREIRO, C. & A. MACHADO
1913. Da reação de Bordet e Gengou na moléstia de Carlos Chagas como elemento diagnóstico. *Brasil Med.*, 27(23):225-226.
10. HOWARD, J. E., C. RÍOS, I. EBENSPERGER & P. OLIVOS
1957. Enfermedad de Chagas congénita. *Bol. Chileno Parasit.*, 12(3):42-45.
11. KABAT, E. A. & M. M. MAYER
1948. *Experimental immunochemistry*. XV+567 pp. Charles C. Thomas Publ., Springfield, Illinois.
12. KELSNER, R. A.
1936. A complement fixation test for Chagas disease employing an artificial uulture antigen. *Amer. Jour. Trop. Med.*, 16(4):405-415.
13. KOLMER, J. A. & E. R. LYNCH
1948. Cardioliipin antigens in the Kolmer complement fixation test for syphilis. *J. Ven. Dis. Inform.*, 29:166-172.

14. MAEKELT, G. A.
1959. Contribución para el estudio de la enfermedad de Chagas en Venezuela. Investigaciones serológicas de la enfermedad de Chagas mediante la reacción de fijación del complemento. *Arch. Venez. Pat. Trop. Parasit. Med.*, 3(1):252-271.
15. NEGhme, A. & J. ROMÁN
1948. Present state of Chagas disease surveys in Chile. *Amer. Jour. Trop. Med.*, 28:835-839.
16. NETO, V. A. & O. MELLONE
1959. Estudo sobre a eficacia da violeta de genciana na profilaxia da transmissão da doença de Chagas em bancos de sangue: investigação em voluntario, receptor de sangue de caso agudo no qual foi adicionado o corante. *O Hospital*, 55(3):343-346.
17. NUSSENZWEIG, V., R. SONNTAG, A. BIANCALANA, J. L. P. DE FREITAS, V. A. NETO & J. KLOETZEL
1953. Ação de corantes trifenil-metânicos sobre o *Trypanosoma cruzi in vitro*. Emprego da violeta de genciana na profilaxia da transmissão da moléstia de Chagas por transfusão de sangue. *O Hospital*, 44(6): 731-744.
18. NUSSENZWEIG, V., R. SONNTAG, J. L. P. DE FREITAS, V. A. NETO, A. BIANCALANA & J. KLOETZEL
1954. Ação de agentes físicos e químicos sobre o *Trypanosoma cruzi in vitro*. *O Hospital*, 45(5):589-599.
19. NUSSENZWEIG, V. A. NETO, J. L. P. DE FREITAS, R. SONNTAG & A. BIANCALANA
1955. Moléstia de Chagas em Bancos de Sangue. *Rev. Hospital Clin.*, 10(4):265-283.
20. NUSSENZWEIG, V., V. A. NETO & O. MELLONE
1959. Novos dados sobre o emprego da violeta de genciana na profilaxia da transmissão da doença de Chagas por transfusão de sangue. *O Hospital*, 55(2): 183-188.
21. PASSALACQUA, C. S. P., V. A. NETO, I. ZATZ & A. DAMASCO
1953. Incidência da doença de Chagas entre os candidatos a doadores de um Banco de São Paulo. Inquérito serológico. *O Hospital*, 43(4):443-447.
22. PELLEGRINO, J.
1949. Transmissão da doença de Chagas pela transfusão de sangue. Primeras comprovações serológicas em doadores e em candidatos a doadores de sangue. *Rev. Brasil. Med.*, 6(5):297-301.
23. PELLEGRINO, J. & Z. BRENER
1952. A reação de fixação do complemento com antígeno de formas de cultura do *S. cruzi* na leishmaniose tegumentar americana. *O Hospital*, 42(6):971-980.
24. PELLEGRINO, J., M. BORROTCHEIN, G. LEITE & Z. BRENER
1951. Inquérito sobre a doença de Chagas em candidatos a doadores de sangue. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, 49:555-564.

25. PORTUGAL, P., O. L. RAMOS, S. CARVALHAL, T. LOPES DA SILVA, N. PALADINO & H. MAFRA
1954. Inquérito clínico epidemiológico e serológico sobre moléstia de Chagas en Municipio de Itaporanga, Estado de São Paulo. *Fol. Clin. et Biol.*, 22(1-2): 69-78.
26. TORRICO, R. A.
1959. Casuística de la enfermedad de Chagas por la reacción de fijación del complemento en cardiacos del Chaco (Argentina). *An. Inst. Med. Reg.*, 5(1): 79-82.
27. UVO, D., A. AGUIAR, S. CARVALHAL, N. PALADINO & N. VALLE
1954. Estudo comparativo dos resultados da R F C para diagnóstico da moléstia de Chagas, obtidos com a realização das técnicas qualitativa e quantitativa. *Fol. Clin. et Biol.*, 22(1-2):85-96.
28. ZELEDÓN, R.
1952. *El problema de la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas en Costa Rica*. Tesis, 109 pp., Minist. Salubridad Pública, San José.
29. ZELEDÓN R.
1952. Estado actual de los estudios epidemiológicos sobre enfermedad de Chagas en Costa Rica. *Rev. Med. C. R.*, 11:169-179.
30. ZELEDÓN, R.
1959. Differentiation of *Trypanosoma rangeli* and *Schizotrypanum cruzi* in a liquid medium, with notes on the nutrition of hemoflagellates. *J. Parasit.*, 45(6):652.
31. ZELEDÓN, R.
1959: La enfermedad de Chagas en Costa Rica. *Rev. Goiana Med.*, 5:439-444.
32. ZELEDÓN, R.
1960. Comunicaciones personales.