

## Estudio Comparativo de dos Métodos para Valoración Cuantitativa de la Parasitemia por Tripanosomas

Ricardo Soto Urribarría\*

### INTRODUCCION

En el estudio biológico de las diferentes especies de tripanosomas, se hace necesario conocer el número aproximado de formas tripomastigotas Hoare<sup>1</sup>, en cultivos o en sangre, para poder valorar el grado de crecimiento y la parasitemia de la cepa en estudio, así como tener una noción exacta del número de parásitos a inocular y los efectos que pueda poseer una droga cuya actividad tripanosomicida se quiera investigar in vitro o in vivo.

Diversos métodos y técnicas han sido utilizados para el estudio cuantitativo de la parasitemia por tripanosomas. Pizzi<sup>2</sup> emplea 5 milímetros cúbicos de sangre colocados sobre una lámina portaobjetos y cubiertos con una laminilla de 22 x 22 mm., utilizando aumentos medianos y de preferencia con sistemas ópticos de contraste de fases, examina al fresco toda la preparación contando todos los parásitos. Cuando el número de formas tripomastigotas es grande, recomienda para facilitar el recuento, emplear una laminilla plástica cuadrículada.

---

\* Cátedra de Parasitología. Facultad de Medicina, Universidad del Zulia.

Petana<sup>3</sup> utiliza en casos de parasitemia elevada, la pipeta de glóbulos rojos, efectuando una dilución de la sangre 1:200 en solución yodo-yodurada, luego de desechar la mezcla que queda en el tubo capilar llena la cámara de Neubauer y cuenta los tripanosomas observados en el retículo de glóbulos rojos, los parásitos se observan muertos y coloreados en marrón. El total de parásitos por milímetro cúbico de sangre lo obtiene, multiplicando por 10.000 el número de tripanosomas contados.

Cuando la parasitemia es baja utiliza la pipeta para glóbulos blancos, con la solución yodo-yodurada hace una dilución de la sangre 1:20 y cuenta los parásitos que aparecen en los retículos de glóbulos blancos. El total de tripanosomas por milímetro cúbico de sangre lo consigue, multiplicando por 50 el número de parásitos contados.

Marsden y cols.<sup>4</sup> expresan la parasitemia basados en el número de formas tripomastigotas encontradas en cien campos de un extendido, examinado con aumento de 500 x.

Lucena<sup>5</sup> utiliza la siguiente técnica: toma una gota de sangre que llene el espacio entre una lámina porta-objetos y una laminilla de 18 x 18 mm., empleando ocular 12 x y objetivo 10 x, cuenta los tripanosomas observados en 100 campos, expresa la parasitemia en flagelados contados por 100 campos microscópicos.

Ayala<sup>6</sup> calcula la parasitemia en extendidos coloreados con Giemsa, escoge campos donde la preparación sea continua y uniforme ("una sola capa de glóbulos"). El número de parásitos por milímetro cúbico lo obtiene mediante la siguiente fórmula: número de parásitos por campo multiplicado por  $1,55 \times 10^7$ .

Finalmente algunos autores acostumbran expresar la parasitemia en número aproximado de tripanosomas, observados por campo microscópico en preparaciones al fresco.

Revisadas las diferentes técnicas empleadas para determinar el número de tripanosomas en sangre, decidimos realizar un estudio comparativo entre las dos técnicas que según nuestra opinión reúnen las mejores condiciones, para expresar en una forma cuantitativa la parasitemia en las tripanosomiasis.

## MATERIAL Y METODOS

Nuestra experiencia está basada en la realización de 90 recuentos, practicados en forma simultánea mediante la técnica de Pizzi<sup>2</sup> modificada y la empleada por Petana<sup>3</sup> para los casos de parasitemias bajas, también con ciertas modificaciones.

Utilizamos una cepa de **Trypanosoma cruzi** Chagas 1909, identificada en el laboratorio como cepa CC, aislada mediante xenodiagnóstico de un paciente con enfermedad de Chagas crónica; esta cepa se mantiene en el laboratorio mediante repiques sucesivos en ratones (*Mus musculus*) por vía intraperitoneal y en cultivos empleando el medio L.I.T.

Realizamos el control cuantitativo de la parasitemia empleando la sangre que fluye de un corte hecho en la cola de los animales en el momento de practicar la prueba, la toma de la muestra y su procedimiento lo efectuamos al mismo tiempo para ambas técnicas con la finalidad de lograr la mayor uniformidad posible en los resultados.

En la técnica de Pizzi<sup>2</sup> seguimos la modificación efectuada por Brener<sup>7</sup>, mediante el empleo de una pipeta de hemoglobina previamente calibrada, se toman 5 milímetros cúbicos de sangre del ratón y se colocan en una lámina portaobjetos, luego cuidadosamente se adosa una laminilla cubre-objetos de 22 x 22 mm. para obtener una capa de sangre distribuida uniformemente; la preparación así elaborada está constituida por 3.500 campos que es el número estimado que existen en un cubre-objetos de 22 x 22 mm. observado con aumento de 450 x (objetivo 45 x ocular 10 x).

El total de parásitos observados en 100 campos, se multiplica por 35 debido a que sólo se contaron cien campos, y se divide entre 5 por ser este el total de milímetros cúbicos de sangre empleados, el resultado nos da el número de parásitos por milímetro cúbico de sangre.

En nuestra experiencia escogimos veinte campos en cada ángulo del cubre-objetos y veinte campos en el centro, para tratar de este modo de evitar en lo posible contar varias veces un mismo parásito, debido a su desplazamiento. Se calculó la parasitemia cuantitativa, multiplicando el total de parásitos contados en los cien campos por siete ya que esta cifra, es el cociente de 35/5.

La otra técnica empleada por nosotros fue la de Petana<sup>3</sup> modificada, utilizando la cámara de Neubauer se practicó en la forma siguiente: con una pipeta de hemoglobina previamente calibrada, se obtienen 5 milímetros cúbicos de sangre y se diluyen en 0.1 c.c. de solución salina al 8,5‰, para obtener una dilución 1:20 con la cual se llena el retículo de la cámara.

Empleando ocular 10 x y objetivo 25 x, se cuentan las formas tripomastigotas observadas en los retículos para glóbulos blancos, el total de parásitos contados se multiplica por 50 y el producto es el total de tripanosomas por milímetros cúbico de sangre.

Para ambas técnicas consideramos como parasitemia submicroscópica los casos en que comprobada la positividad, no observamos tripanosomas en los cien campos para el método de Pizzi<sup>2</sup> modificado, o en los cuatro retículos de blancos; en esos casos expresamos la parasitemia como menor de 7 y menor de 50 por milímetro cúbico de sangre respectivamente.

## RESULTADOS

Con los resultados obtenidos en los 90 recuentos practicados simultáneamente con ambos métodos (Cuadro I), procedimos a la siguiente formulación de hipótesis:

1— Cuál de las dos pruebas es más fidedigna:

2— Si las variaciones observadas en la parasitemia de ratones infectados con **Trypanosoma cruzi** es significativa o no.

Verificación de la hipótesis.

Para tal efecto se procedió a someter a pruebas de significancia estadística las muestras, resumiendo por promedio las variaciones observadas, con un 95% de certeza aplicamos la fórmula de la diferencia de los promedios con una hipótesis nula de que los promedios eran iguales.

$$Z = \frac{\mu_1 - \mu_2}{S_{\mu_1 - \mu_2}}$$

Con las siguientes hipótesis si:

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$$

$$H_a: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$$

$H_0$  = hipótesis observada

$\mu_1 - \mu_2$  = diferencia de los promedios

$H_a$  = hipótesis alternativa.

Los resultados obtenidos fueron de  $-1.66$  que llevados a la curva normal está dentro del área de aceptación de la nula hipótesis.

Por lo anteriormente expuesto se deduce que las variaciones entre ambas pruebas no tienen significancia estadística y las observaciones son debidas al azar, en lo que respecta a determinar cuál de las dos pruebas es la más adecuada, queda a criterio del técnico.

## COMENTARIOS Y CONCLUSIONES

En la revisión hecha en la primera parte del trabajo presentamos en forma resumida, el fundamento de las técnicas empleadas para el recuento de tripanosomas en sangre, escogimos las utilizadas para el presente trabajo debido a las siguientes consideraciones sobre las otras técnicas:

Técnica de Petana<sup>3</sup> la recomendada por este autor cuando la parasitemia es baja, prácticamente es la misma empleada por nosotros en la cámara, con la diferencia de que utiliza la pipeta de glóbulos blancos, y la dilución la efectúa en solución yodo-yodurada, lo cual consideramos una desventaja debido a ser una solución muy inestable, ya que los precipitados de yodo pueden enmascarar los tripanosomas los cuales se observan con esta técnica muertos y teñidos de marrón.

El método empleado por Marsden y cols.<sup>4</sup>, no expresa la parasitemia por volumen de sangre, sino en cien campos contados en un extendido, no sabemos la cantidad de sangre a utilizar exactamente en cada uno de los extendidos, para comparar su valor con el de otras pruebas.

En el método utilizado por Lucena<sup>5</sup>, tampoco conocemos exactamente la cantidad de sangre a utilizar, debido a que expresa la parasitemia en número de parásitos contados en cien campos, de una preparación cuyo volumen estima en 0.01 c.c., el cual sería

la cantidad de sangre que llena el espacio comprendido entre una lámina porta-objetos y una laminilla de 18 x 18 mm.

La técnica empleada por Ayala<sup>6</sup>, tampoco conocemos la cantidad de sangre a utilizar para practicar el extendido, lo cual consideramos necesario para uniformar lo más posible las técnicas a comparar, además en los casos de parasitemia baja, son muchos los campos que es necesario recorrer, para observar los tripanosomas.

La escogencia de las dos técnicas utilizadas en nuestra experiencia se basó, en el hecho de que en ambas podríamos tener la seguridad de emplear siempre el mismo volumen de sangre. En vista de que estadísticamente las variaciones entre ambas técnicas no tienen significancia, y las observadas son debidas al azar, consideramos basados en la experiencia adquirida que:

—La técnica de Pizzi, es más simple, no necesita diluciones y utiliza menos equipo. La consideramos de mayor utilidad en los casos de parasitemia baja, ya que examinamos sangre no diluida, el recuento se realiza con rapidez y seguridad; cuando la parasitemia es elevada, la determinación de la cuantía es más prolongada y se corre el riesgo de contar varias veces un mismo tripanosoma debido a sus desplazamientos.

Empleando la cámara de Neubauer en casos de parasitemia elevada permite realizar el recuento en menor tiempo y hay menos posibilidades de contar varias veces un mismo tripanosoma, debido a la mayor dispersión de los parásitos por la dilución.

Concluimos que se debe emplear la técnica de Pizzi en los casos de parasitemia baja y el método de la cámara de Neubauer en las parasitemias elevadas, por las consideraciones estadísticas y de orden práctico mencionadas anteriormente.

## RESUMEN

El autor efectúa una comparación entre las técnicas de Pizzi y la de Petana con modificaciones por él propuestas, para valoración cuantitativa de la parasitemia por tripanosomas, realiza 90 determinaciones simultáneas con ambas técnicas y somete a

pruebas de significancia estadística las muestras. Los resultados obtenidos indican que las variaciones entre ambas pruebas no tienen significancia estadística y las observadas son debidas al azar.

Concluye considerando que en los casos de parasitemia baja es recomendable la técnica de Pizzi modificada, y en parasitemias elevadas recomienda la técnica de Petana con las modificaciones por él propuestas.

### CUADRO I

Resultados obtenidos en 90 determinaciones de parasitemia cuantitativa por tripanosomas, empleando dos técnicas diferentes.

Pizzi	Cámara	Pizzi	Cámara	Pizzi	Cámara
<7	<50	189	250	1.498	1.450
7	<50	203	350	1.617	2.500
7	<50	259	250	1.883	2.050
7	<50	259	150	1.904	2.150
7	50	287	450	1.967	2.700
14	<50	315	250	2.100	3.300
21	50	364	135	2.338	3.200
21	100	434	300	2.443	1.600
35	150	455	700	2.499	2.800
35	50	504	1.000	2.548	2.300
35	250	560	350	2.695	2.400
49	200	602	750	2.758	6.250
49	50	616	1.300	2.856	4.250
56	50	616	550	2.933	1.850
56	150	784	2.850	2.940	3.350
70	50	784	700	2.940	1.900
77	100	868	900	2.954	3.700
84	50	882	1.450	3.283	2.700
84	100	896	800	3.288	2.600
91	100	1.043	4.400	3.360	4.550
98	100	1.078	2.100	3.752	4.500
98	100	1.092	800	3.857	7.450
98	500	1.113	3.100	3.955	6.600
112	100	1.120	1.500	4.060	4.250
119	100	1.176	1.450	4.382	6.400
126	150	1.204	1.200	5.348	7.750
133	450	1.307	5.500	6.881	12.250
154	150	1.414	2.200	7.140	8.350
161	300	1.442	1.750	8.624	14.000
189	550	1.149	1.800	8.687	14.200

## BIBLIOGRAFIA

- 1 — HOARE, C. A. y Wallace, F. G.— Developmental Stages of Trypanosomatid Flagellates: a New Terminology. *Nature* Vol. 212 (5068): 1385-1386, 1966.
- 2 — PIZZI, F.— Inmunología de la Enfermedad de Chagas. Universidad de Chile, Santiago. Cap. 2, p. 41, 1957.
- 3 — PETANA, W. B.— A Method for counting trypanosomes using Gram's iodine as diluent. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 57 (5): 382-383, 1963.
- 4 — MARSDEN, P. D.; Voller, A.; Seah, S. K. K.; Hawkey, C. y Green, D.— Behaviour of a Peru strain of *Trypanosoma cruzi* in Rhesus monkeys. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 4 (3): 176-182, 1970.
- 5 — LUCENA, D. T.— Estudos sobre a doença de Chagas no nordeste do Brasil. *Rev. Bras. Malariol. D. Trop.* 22 (1): 3-173, 1970.
- 6 — AYALA, S. C.— Experiencias parasitológicas de los estudiantes de Medicina de la Universidad del Valle. *Acta Med. Volle.* 3 (4): 157-162, 1972.
- 7 — BRENER, Z.— Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 4 (6): 389-396, 1962.