

COMPROVAÇÃO PARASITOLÓGICA NA FASE CRÔNICA DA DOENÇA DE CHAGAS POR HEMOCULTURAS SERIADAS EM MEIO "LIT"

Oto G. Mourão ** e Egler Chiari ***

Foram realizadas hemoculturas seriadas, semeando-se 0,2 ml de sangue de pacientes com Doença de Chagas na fase crônica, em cada um de 14 tubos de ensaio contendo 6 ml de meio LIT. O exame foi repetido por 3 dias consecutivos, obtendo-se um total de 42 tubos semeados, correspondentes a uma série. A colheita do material foi repetida 30 e 60 dias após. As hemoculturas foram mantidas a 28°C e examinadas com 30, 45 e 60 dias.

Dos 1337 tubos semeados 54 apresentaram-se positivos, observando-se que a maior frequência de tubos positivos ocorreu após 45 dias de incubação, o que permitiu o diagnóstico parasitológico de 13 entre 15 pacientes examinados (86,6%).

A hemocultura seriada em meio LIT deve ser considerada como uma técnica a ser utilizada na triagem de pacientes para ensaios clínicos ou outros tipos de pesquisas que indiquem a necessidade de prévio diagnóstico parasitológico. Por ser um método trabalhoso e demorado não é possível recomendar o seu emprego em diagnóstico de rotina.

INTRODUÇÃO

A utilização da hemocultura como método de diagnóstico parasitológico da Doença de Chagas durante a fase crônica tem sido limitada pelos baixos índices de positividade obtidos. No entanto, permanece a necessidade de padronização de métodos que permitam detectar o *Trypanosoma cruzi* em pacientes na fase crônica. A análise dos resultados obtidos por Chiari & Brener (4), quando utilizaram o meio LIT em hemoculturas, sugere que a associação deste método à técnica de hemoculturas seriadas poderia aumentar a sensibilidade do método, permitindo o seu emprego na seleção de pacientes parasitologicamente comprovados, que se destinam a ensaios clínicos e na avaliação terapêutica da ação de novos compostos.

MATERIAL E MÉTODOS

De acordo com o esquema de Albuquerque & cols (1), foram realizadas três colheitas em dias sucessivos, de 3 ml de sangue colhidos com 30 unidades de heparina diluídas em 0,5 ml de solução salina fisiológica a 0,85%. Após cada colheita o material foi semeado em 14 tubos com meio LIT na proporção de 0,2 ml de sangue para cada tubo, contendo 6 ml de meio. Foram realizadas 3 séries de exames, com intervalo de 30 dias para cada série. O material foi incubado a 28°C e os exames foram realizados aos 30, 45 e 60 dias após a colheita. O material para exame foi retirado com alça de platina do fundo dos tubos, colocado entre lâmina e laminula e examinado com aumento de x450. Após 60 dias, os tubos negativos foram submetidos à centrifuga-

* Trabalho realizado no Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da UFMG, Serviço de Investigação da Doença de Chagas sob a direção do Prof. J. Romeu Cançado e Departamento de Zoologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

** Prof. Adjunto do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da UFMG.

*** Prof. Adjunto, e Pesquisador do C. P. "René Rachou", INERu, FIOCRUZ.
Recursos Proc. 10810 CNPq, TC 46 Doenças de Chagas, e da Fundação de Amparo as Pesquisas Parasitológicas.

ção a 3 000 rpm por 10 minutos e a seguir o sedimento examinado.

RESULTADOS

As hemoculturas seriadas realizadas em 15 pacientes na fase crônica da Doença de Chagas demonstraram que utilizando-se duas ou três séries de colheitas a maior frequência de resultados positivos foi obtida após 45 dias de incubação a 28°C (Tabela 1). Não foi observada nenhuma relação direta entre a série e a positividade do exame no sentido do respectivo aumento desta, sendo portanto aleatória a possibilidade de uma hemocultura positiva, desde que se aumente o número de tubos semeados (Tabela 3). No entanto, a probabilidade de obtenção de hemoculturas positivas está relacionada ao número de tubos semeados (Tabela 2), semelhante ao que ocorre com a técnica de xenodiagnóstico de Schenone (9) onde o aumento do número de triatomíneos concorre para obter-se uma maior positividade.

A positividade das hemoculturas seriadas foi de 86,6% (Tabela 3), sendo que 53,3% dos resultados positivos foram obtidos com a 1.ª série de colheitas e 33,3% na 2.ª série. A utilização de uma 3.ª série não concorreu para elevar a positividade global do método.

DISCUSSÃO

A partir dos resultados de Chiari & Brener (4), quando foi demonstrada a infecção por *T. cruzi*, em 25,7% entre 35 pacientes, utilizando-se o meio "LIT", o conceito de que a hemocultura teria um papel secundário quando aplicada ao diagnóstico da doença de Chagas (7; 8) merece ser revisto. Embora o xenodiagnóstico seja o método parasitológico amplamente utilizado no diagnóstico da fase crônica, o tempo requerido para a obtenção de ninfas, do 3º ou 4º estágio, de triatomíneos necessariamente criados em laboratório e a possibilidade de ocorrência de contaminação das colônias de triatomíneos com *Blastocytidia triatominae* (3), devem ser levados em consideração. Além disto, segundo Neal (6), enquanto 10 tripomastigotos sanguíneos, no inóculo, são suficientes para se obter uma hemocultura positiva são necessários 600 tripomastigotos para que o mesmo resul-

tado seja obtido através do xenodiagnóstico. As positivities mais altas obtidas pelo xenodiagnóstico são de 50 a 70%, segundo Schenone (9).

Como durante a fase crônica os pacientes apresentam uma parasitemia residual extremamente discreta e o crescimento do *T. cruzi* em diferentes meios de cultura provavelmente está relacionado a uma série de fatores adaptativos e nutricionais, há necessidade de se prolongar a observação das hemoculturas durante um tempo suficiente, para que os poucos flagelados semeados se multipliquem, atingindo uma concentração detectável ao exame a fresco, entre lâmina e lamínula. Nas condições utilizadas (meio LIT e incubação a 28°C) a maior frequência de hemoculturas positivas foi observada 45 dias após a semeadura, o que vem evidenciar a necessidade de se prolongar os exames pelo período mínimo de 60 dias.

Embora os resultados apresentados na Tabela 2 tenham demonstrado que não foi possível aumentar a sensibilidade do método, através da utilização de uma 3.ª série de colheitas, a observação dos resultados obtidos por paciente (Tabela 1) assinalou que a obtenção de hemoculturas positivas é aleatória, sendo no entanto uma decorrência da repetição dos exames (Tabela 2), como já haviam admitido Chiari & Brener (4). Portanto a distribuição da frequência de hemoculturas positivas por pacientes, por colheita ou por série pode apresentar variações entre diferentes experimentos, sendo aconselhável a manutenção de um esquema padronizado que possibilite uma análise comparativa dos resultados obtidos.

Com a utilização de hemoculturas seriadas em meio LIT foi possível comprovar a presença do *T. cruzi* em 86,6% dos pacientes examinados. Estes resultados, bem mais promissores que os obtidos anteriormente, demonstraram que com a utilização de um meio de cultura que fornece condições adequadas ao crescimento do *T. cruzi* associado a colheitas seriadas de sangue foi possível alcançar o objetivo basicamente visado: aumentar a sensibilidade do método de hemocultura. Deve-se ainda aventar a possibilidade do emprego do meio de Warren, recomendado por Neal (6) e que por ser autoclavável seria mais fácil de preparar que o meio LIT.

TABELA 1

Freqüência de positividade de hemoculturas seriadas, em pacientes na fase crônica da Doença de Chagas, em meio LIT

PACIENTES				Número de Tubos Semeados	Hemoculturas positivas de acordo com o tempo de incubação em dias			Número de tubos positivos
Número	Idade	Xeno-diagnóstico	Reação de Guerreiro e Machado *		30	45	60	
1	41	+	R	126	1	7	5	13
2	35	+	R	126	—	—	1	1
3	32	+	R	126	—	—	1	1
4	40	+	R	84	—	1	3	4
5	38	+	R	42	—	3	—	3
6	22	+	R	42	—	2	1	3
7	47	+	R	126	—	—	—	0
8	19	+	R	84	—	—	2	2
9	52	+	R	42	1	—	—	1
10	23	+	R	42	—	10	—	10
11	39	...	R	84	1	3	1	5
12	34	...	R	126	—	—	—	0
13	35	...	R	126	—	1	1	2
14	52	...	R	70	—	1	1	2
15	50	...	R	84	—	4	3	7
TOTAL				1337	3	32	19	54

* R = Reagente

TABELA 2

Positividade por série, relacionada com o número de tubos semeados

Série	Número de Tubos		% Positividade
	Semeados	Positivos	
1. ^a	616	27	4,3
2. ^a	448	19	4,2
3. ^a	273	8	2,9
TOTAL	1337	54	4,0

TABELA 3

Positividade de hemoculturas seriadas em 15 pacientes na fase crônica do Doença de Chagas

Série	Hemoculturas positivas	% Positividade
1. ^a	8	53,3
2. ^a	5	33,3
3. ^a	0	0,0
TOTAL	13	86,6

SUMMARY

Serial hemocultures were made on blood from 15 Chagas' Disease patients using a modification of the technic described by Albuquerque et al (1). Warren's medium was substituted by "LIT" — ("Liver-infusion tryptose") medium.

0.2 ml of blood from each patient was added to each one of 14 culture tubes each containing 6 ml of "LIT" medium on 3 consecutive days. The whole process was repeated 3 times at 30 days interval. 54 positive tubes (4,0%) were obtained. These results gave a positive parasitological diagnosis in 13 out of the 15 patients (86,6%).

The results obtained demonstrated that there is a residual blood parasitemia in patients with chronic Chagas' disease but that there are also variations in the parasitemia of different individuals. Serial hemocultures has been found to be a reliable diagnostic method although very time - consuming and its effectiveness is proportional to the number of isolations made from a patient.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBUQUERQUE, R. D. R., FERNANDES, L. A. R., FUNAYAMA, G. K. FERRIOLLI, F. F. & SIGUEIRA, A. F. — Hemoculturas seriadas com o meio de Warren em pacientes com reação de Guerreiro-Machado positiva. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 14: 1-5, 1972.
2. CAMARGO, E. F. — Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 6: 93-100, 1964.
3. CERISOLA, J. A., DEL PRADO, C. E., ROHWEDDER, R. & BOZZONI, J. P. *Blastocrithidia triatominae* n. sp. found in *Triatoma infestans* from Argentina. *The J. Protozool.* 18: 503-506, 1971.
4. CHIARI, E. & BRENER, Z. — Contribuição ao diagnóstico parasitológico da doença de Chagas na sua fase crônica. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 8: 134-138, 1966.
5. FERNANDES, J. F. & CASTELLANI, O. — Perspectiva de vacinação contra moléstia de Chagas. *XVI Reunião ANUAL da S.B.P.C., Ribeirão Preto SP*, 1964.
6. NEAL, R. A. — Superiority of the culture technic over xenodiagnosis for detection of trypanosomes in Chagas' disease. *IX International Congress of Tropical Medicine and Malaria. Athens*, Volume I, 14-21, October, 1973.
7. PEDREIRA DE FREITAS, J. L. — Contribuição para o estudo do diagnóstico da moléstia de Chagas por processos de laboratório. *Tese. Fac. Med. Univ. São Paulo*, 1947.
8. PIFANO, F. C. — El diagnóstico parasitológico de la enfermedad de Chagas en fase crónica. Estudio comparativo entre gota gruesa, el xenodiagnóstico, el hemocultivo y las inoculaciones experimentales en animales sensibles. *Arch. Venez. Patol. Trop. & Parasit. Med.* 2: 146-151, 1954.
9. SCHENONE, H. et al. — Valor del xenodiagnóstico en la infección Chagásica crónica. *Bol. Chil. Parasit.* 23: 149-154, 1968.