

# HEMOCULTURAS PARA O DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO NA FASE CRÔNICA DA DOENÇA DE CHAGAS \*

Oto G. Mourão\* e Odeni C. Mello\*\*

*Os autores apresentam o resultado de hemoculturas de 20 chagásicos crônicos, em meio LIT.*

*Usaram como inóculo o concentrado de células de 10 ml de sangue, lavado em solução fisiológica após remoção do plasma por centrifugação a 3.000 r.p.m. A papa, assim obtida, foi semeada em porções iguais em dois tubos contendo, cada um, 5 ml de LIT.*

*Com uma única hemocultura obtiveram 6 casos positivos (30%). Números variáveis de hemoculturas, 1 a 14, nos 20 pacientes, possibilitaram a positividade de 9 casos (45%). Submetendo 7 pacientes a 4 ou mais hemoculturas (4, 5, 6, 10 e 14), 5 dentre eles mostraram-se positivos (71,4%).*

*Recomendam o método para a rotina por ser prático e de fácil execução.*

## INTRODUÇÃO

Embora em 1949 Pifano<sup>(9)</sup> tenha relatado 5 hemoculturas positivas em 80 chagásicos crônicos (6,25%), o conceito que vem prevalecendo é o de que a hemocultura é impraticável na fase crônica da moléstia de Chagas. Para isto muito contribuíram os trabalhos de Freitas<sup>(4,5,6)</sup> em 1947, 1952, 1958 que reiteradamente mostraram resultados negativos nos meios de Bonacci e N.N.N.

Em 1966 Chiari & Brener<sup>(2)</sup>, usando o LIT, obtiveram 9 casos positivos (25,7%) em 35 portadores da doença de Chagas crônica. Para obter esses resultados semearam 15 ml de sangue de cada paciente em 8 tubos, 3 com o sangue total, 3 com o sobrenadante e 2 com o sedimento de uma alíquota centrifugada.

Nesse mesmo ano, um de nós, Mourão<sup>(7)</sup>, relatou, usando meio próprio, positividade de 83,3% em 50 pacientes. Esse trabalho, no entanto, é destituído de valor, porque ficou provado que o técnico, que colaborou na pesquisa, introduziu tripanosomas no meio.

Em 1972, Albuquerque e cols<sup>(1)</sup> relataram o resultado de hemoculturas seriadas de 38 casos, em meio de Warren, com positividade de 100%. Nas nossas mãos, porém, o método não se reproduziu.

Conclui-se, portanto, que a hemocultura na fase crônica da moléstia de Chagas é possível, podendo a positividade alcançar níveis de 25,7%, conforme obtiveram Chiari e Brener<sup>(2)</sup>

O presente trabalho possibilita a cultura em apenas 2 tubos e procura aumentar essa positividade, pela remoção do plasma

\* Trabalho realizado no Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da U.F.M.G., Serviço de Investigação da Doença de Chagas sob a direção do Prof. J. Romeu Cançado.

\*\* Prof. Adjunto do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da U.F.M.G.

\*\*\* Universitária da Faculdade de Medicina da U.F.M.G.

Recebido para publicação em 18.4.75.

# TABELA I

CULTIVO DO TRYPANOSOMA CRUZI A PARTIR DE CÉLULAS SANGUÍNEAS, LAVADAS, DE CHAGÁSICOS CRÔNICOS

POSITIVIDADE POR PACIENTE

PACIENTES	HEMOCULTURAS													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
G.G.S.	P	P	P	P	N	P	P	N	P	N	P	N	N	N
F.S.P.	P	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
R.L.A.	N	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
J.P.C.C.	N	P	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
M.C.S.	N	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
O.D.R.	P	P	P	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
W.A.C.	N	P	N	N	P	---	---	---	---	---	---	---	---	---
R.Q.V.	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	---	---	---	---
L.C.S.	N	N	N	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
O.P.S.	N	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A.A.	N	N	N	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
M.F.O.	P	N	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
R.A.C.	N	N	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
S.A.O.	N	N	N	N	N	---	---	---	---	---	---	---	---	---
M.C.O.	N	N	N	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
I.G.C.	N	N	N	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A.M.	N	N	N	N	N	P	---	---	---	---	---	---	---	---
A.F.M.	P	P	P	P	N	P	---	---	---	---	---	---	---	---
F.F.S.	N	N	N	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A.M.L.	P	N	N	N	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

P = POSITIVA  
N = NEGATIVA

CADA HEMOCULTURA CONSTA DE 2 TUBOS CONTENDO CADA UM 5 ML DE LIT. E O CONCENTRADO DE CÉLULAS DE 5 ML DE SANGUE.

e lavagem dos elementos figurados do sangue, na tentativa de eliminar ou pelo menos reduzir a ação de substâncias nocivas ao crescimento como: complemento, proferdina, betalísina, liozima e possivelmente anticorpos contra o *Tripanosoma cruzi*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. PACIENTES

Esta pesquisa foi realizada em 20 pacientes portadores de doença de Chagas, na fase crônica, todos com a reação de Guerreiro-Machado reativa, 11 dentre eles internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da U.F.M.G., selecionados pelo xenodiagnóstico positivo, para ensaios terapêuticos da doença.

### 2. MEIO USADO

LIT<sup>(3)</sup> distribuído em dois tubos na quantidade de 5 ml em cada tubo.

### 3. COLHEITA, PREPARO E SEMEADURA

a) Dez ml de sangue, colhidos com os devidos cuidados de assepsia, (lavagem do antebraço com água e sabão seguida, com o local ainda úmido, de aplicação de éter-acetona e mertiolato) são transferidos, em quantidades iguais (5 ml), para cada um de 2 tubos de centrifuga de 15 ml de capacidade, contendo 1,5 ml de solução de heparina de 5.000 u.i./ml, diluída a 6/1000 em soro fisiológico, previamente autoclavados.

b) Os tubos são, em seguida, centrifugados a 3.000 r.p.m. durante meia hora.

O sobrenadante é removido, em condição asséptica, por intermédio de seringa de 10 ml e agulha de 8 x 80, tendo-se o cuidado de não atingir a camada de plaquetas e leucócitos.

c) São, a seguir acrescentados a cada tubo, em condições assépticas, 5 ml de soro fisiológico previamente autoclavado.

Na medida do possível, o material é homogeneizado e centrifugado novamente, a 3.000 r.p.m. por 15 minutos.

d) Após remoção do sobrenadante, cuidando ainda em não retirar a camada de plaquetas e leucócitos, o sedimento é se-

meado por intermédio de pipeta de 5 ml, em 2 tubos contendo cada um 5 ml de LIT.

e) Os tubos são incubados a 28°C e examinados aos 30, 45 e 60 dias.

f) O exame microscópico é feito em pequena gota, removida do fundo do tubo, por meio de alça de platina e disposta entre lâmina e lamínula (aumento de x 450).

Após 60 dias, o material dos tubos negativos é centrifugado e o sedimento examinado.

## RESULTADOS

Na tabela I verifica-se que dos 20 pacientes, 9 (45%) mostraram-se positivos.

Seis (30%), dos 20 casos, positivaram-se na primeira hemocultura.

Na tabela II são apresentados os resultados dos 20 pacientes variando o número de hemoculturas por paciente. Dezoito, dentre eles, foram submetidos individualmente a entre uma a seis hemoculturas; dos dois restantes, uma paciente submeteu-se a 10 e outra a 14. Nos casos em que se fez mais de uma hemocultura, as seguintes foram sucessivas, na maioria das vezes, porém nunca colhidas no mesmo dia.

Em 13 pacientes, procedendo a números variáveis de hemoculturas, porém acima de 2 (3, 4, 5, 6, 10 e 14), conseguimos positivar 6 casos (46,1%).

Sete pacientes submetidos também a números variáveis de hemoculturas, porém acima de 3 (4, 5, 6, 10 e 14), mostraram 5 casos positivos (71,4%).

A paciente em que fizemos 10 hemoculturas apresentou todas negativas, a em que fizemos 14 apresentou 8 positivas (tabela I).

A tabela III mostra a positividade por tubos; foram obtidos 25 tubos positivos (17%) no total de 146.

Na mesma tabela são apresentadas as variações da positividade por tempo de incubação. Três tubos (12%) positivaram-se aos 30 dias, 8 (32%) aos 45 dias e 14 (56%) aos 60 dias. A positividade de 6 tubos (24%), somente foi obtida após centrifugação do material cultivado.

## DISCUSSÃO

Já estávamos com esse trabalho em andamento, quando um de nós, Mourão, ini-

## TABELA II

RESULTADO DO  
CULTIVO DO *TRYPANOSOMA CRUZI* A  
PARTIR DO CONCENTRADO DE CÉLULAS  
SANGUÍNEAS LAVADAS, VARIANDO-SE O NÚ-  
MERO DE HEMOCULTURAS POR PACIENTE

N.º DE HEMOCULTURAS POR PACIENTE	TOTAL DE PACIENTES	RESULTADO / PACIENTE	
		POSITIVO	NEGATIVO
1	4	1	3
2	3	2	1
3	6	1	5
4	1	1	0
5	2	1	1
6	2	2	0
10	1	0	1
14	1	1	0

ciou com Chiari o estudo de hemoculturas seriadas em meio LIT. O resultado dessa pesquisa que se acha em publicação (3), ao possibilitar o diagnóstico parasitológico de 13 de 15 pacientes, parece demonstrar que o parasita pode ser cultivado, sistematicamente, a partir do sangue de enfermos crônicos da doença de Chagas e que a positividade é fator dependente do número de hemoculturas praticadas.

O processo, infelizmente, embora eficiente para demonstrar a parasitemia, é muito trabalhoso. Para obter a positividade dos 13 pacientes, a investigação se estendeu por cerca de um ano; foram examinados 1.337 tubos, por 3 vezes consecutivas (30, 45 e 60 dias), para a obtenção de 54 tubos positivos (4%).

É difícil comparar-se a positividade por nós alcançada e a obtida por Chiari e Brener (2). Enquanto o nosso inóculo é constituído pelo concentrado de células de 10 ml de sangue, para a semeadura de 2 tubos, o daqueles autores é constituído pelo sedimento, pelo sobrenadante e por uma fração integral (1/5), de 15 ml de sangue de cada paciente.

Comparando-se apenas a positividade que obtivemos em uma única hemocultura, 30%, verificamos que os nossos resultados são superiores porque trabalhamos com menos tubos e fizemos número menor de exames. Enquanto aqueles autores semea-

ram 280 tubos e obtiveram 15 positivos (5,36%), nós examinamos, no conjunto de hemoculturas dos 20 pacientes, 146 tubos e obtivemos 25 tubos positivos (17%).

Pode-se concluir dessa discussão que, embora o trabalho de Chiari e Brener (2) e Mourão e Chiari (3) sejam fundamentais para a demonstração das possibilidades no cultivo do *Trypanosoma cruzi*, na fase crônica da doença de Chagas, a partir do sangue, são impraticáveis pelo vulto do trabalho que exigem.

O processo ora exposto, a não ser pelas dificuldades inerentes ao preparo do LIT, é prático, de execução relativamente fácil, sendo recomendável para o diagnóstico parasitológico na fase crônica da doença.

Evidentemente seria mais prático a semeadura direta do sangue em meio LIT, porém em experiências anteriores, não publicadas, não fomos capazes de cultivar o tripanosoma, quando empregávamos volumes de sangue, como os 5 ml para cada tubo, da presente experiência. Por esse motivo não incluímos nesta série hemoculturas simultâneas de sangue e concentrado de células. Isto nos impede de concluir se a positividade alcançada resulta de substâncias nocivas ao crescimento, contidas no plasma.

Finalmente, nossas observações (tabela I) parecem mostrar que a positividade é

TABELA III

CULTIVO DO *TRYPANOSOMA CRUZI* A PARTIR DO CONCENTRADO DE CÉLULAS LAVADAS, DO SANGUE DE CHAGÁSICOS CRÔNICOS, EM MEIO LIT.

POSITIVIDADE POR TUBO

Nº	PACIENTES	IDADE	SEXO	XENODIAGNÓSTICO	REAÇÃO DE G.M.	TUBOS				QUANTIDADE DE TUBOS
						POSITIVOS dias de incubação			NEGATIVOS	
						30	45	60	apos 60 dias de incubação e após centrifugação	
1	G.G.S.	38	♀	+	R	1	2	6	14	23
2	F.S.P.	40	♂	+	R	0	1	0	1	2
3	R.L.A.	55	♂	---	R	0	0	0	2	2
4	J.P.C.C.	41	♂	+	R	0	0	1	3	4
5	M.C.S.	47	♀	+	R	0	0	0	2	2
6	O.D.R.	35	♀	---	R	0	3	1	2	6
7	W.A.C.	19	♂	+	R	1	1	0	8	10
8	R.Q.V.	34	♀	---	R	0	0	0	20	20
9	L.C.S.	36	♀	---	R	0	0	0	6	6
10	O.P.S.	35	♂	+	R	0	0	0	2	2
11	A.A.	46	♂	+	R	0	0	0	6	6
12	M.F.O.	23	♀	+	R	0	1	0	3	4
13	R.A.C.	52	♀	+	R	0	0	0	3	3
14	S.A.O.	52	♂	---	R	0	0	0	10	10
15	M.C.O.	41	♂	+	R	0	0	0	6	6
16	I.G.C.	66	♀	---	R	0	0	0	6	6
17	A.M.	39	♂	---	R	0	0	1	11	12
18	A.F.M.	50	♂	---	R	0	0	5	7	12
19	F.F.S.	44	♀	---	R	0	0	0	6	6
20	A.M.L.	32	♀	+	R	1	0	0	3	4
T O T A L						3	8	14*	121	146
							25			

\* 6 TUBOS POSITIVARAM-SE NO SEDIMENTO DO MATERIAL CENTRIFUGADO

R = REATIVA

O = NEGATIVO

caráter variável de paciente a paciente. No caso R.Q.V. não obtivemos nenhum resultado positivo apesar de 10 tentativas, enquanto que a paciente G.G.S. apresentou 8 de 14 hemoculturas positivas (57,2%), o paciente A. M., 5 de 6 (83,3%) e a pa-

ciente O.D.R. mostrou positividade nas 3 hemoculturas a que se submeteu.

AGRADECIMENTOS

A srta. Maria de Lourdes Ferreira por ajuda técnica.

SUMMARY

The authors have developed a process to make hemocultures in chronic phase of human Chagas' disease.

They used as inocule the washed packed cells of 10 ml of blood. This material was sampled in 2 tubes of LIT (Liver Infusion Tryptose) with 5 ml of the medium.

*Six positive cases (30%) were detected with only one hemoculture.*

*Increasing the number of hemocultures (1 to 14) 9 out of 20 cases were positives (45%). In 7 cases 4 or more hemocultures (4, 5, 6, 10, 14) were made and 5 of them were positives (71,4%).*

*The authors recomend the method for routine as a practical and easy method.*

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBUQUERQUE, R. D. R., FERNANDES, L. A. R., FUNAYAMA, G. K., FERRIOLI, F. F. e SIQUEIRA, A. F. — Hemoculturas seriadas com meio de Warren em pacientes com reação de Guerreiro-Machado positiva. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 14:1-5, 1972.
2. CHIARI, E. & BRENER, Z. — Contribuição ao diagnóstico parasitológico da Doença de Chagas na fase crônica. *Rev. Inst. Med. trop., São Paulo*, 8:134-148, 1966.
3. FERNANDES, J. F. & CASTELLANI, O. — Perspectiva de vacinação contra a moléstia de Chagas. XVI Reunião anual da S.B.P.C., Ribeirão Preto, São Paulo, 1964.
4. FREITAS, J. L. P. — Contribuição para o estudo do diagnóstico da moléstia de Chagas por processos de laboratório. São Paulo, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 1947. 160 p. Tese.
5. FREITAS, J. L. P. — O diagnóstico de laboratório da moléstia de Chagas. *Rev. Clín. São Paulo*, 28:1-10, 1952.
6. FREITAS, J. L. P. — Processos de laboratório para o diagnóstico da moléstia de Chagas. *Rev. Goiana Med.* 4:135-147, 1958.
7. MOURÃO, O. G. — Diagnóstico parasitológico da Doença de Chagas na fase crônica. Método para avaliação da terapêutica no homem. Belo Horizonte, Faculdade de Medicina da U.F.M.G., 1966, 69 p. Tese.
8. MOURÃO, O. G. & CHIARI E. — Comprovação parasitológica da Doença de Chagas na fase crônica, por hemoculturas seriadas em meio LIT. *Rev. Soc. Bras. Med. trop. (in press)*.
9. PIFANO, F. C. — El diagnóstico parasitológico de la enfermedad de Chagas en fase crônica. Estudio comparativo entre la gota gruesa, el xenodiagnóstico, el hemocultivo y las inoculaciones experimentales en animales sensibles. *Archiv. Venezol. Patol. Trop. y Parasit. Med.* 2:121-152, 1954