

CONTRIBUIÇÃO AO DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS NA SUA FASE CRÔNICA

E. CHIARI e Z. BRENER

RESUMO

Com a finalidade de aumentar os índices de comprovação parasitológica na fase crônica da doença de Chagas humana, os Autores empregaram conjuntamente o xenodiagnóstico e a hemocultura no meio líquido "LIT" descrito por YAEGER. A hemocultura foi realizada semeando-se sangue total diretamente no meio, assim como o sobrenadante e sedimento de sangue centrifugado. Em 35 pacientes com reação de fixação do complemento positiva, o xenodiagnóstico foi positivo em 31,4% dos casos e a hemocultura, em 25,7%, ao passo que ambos os métodos conseguiram comprovar parasitológicamente 42,8% dos examinados.

Os Autores chamam a atenção para a importância da associação de ambos os métodos na comprovação parasitológica e no controle da atividade de agentes quimioterápicos na fase crônica da doença de Chagas humana.

INTRODUÇÃO

A precariedade dos recursos laboratoriais na comprovação parasitológica da doença de Chagas na sua fase crônica é fato reconhecido por todos. Métodos de laboratório como o xenodiagnóstico, inoculação em animais sensíveis, hemocultura e cultivo com o líquido céfalo-raquidiano, têm fornecido, em geral, baixos índices percentuais de positividade. Reconhecendo a necessidade de diagnosticar parasitológicamente maior número de casos crônicos da doença de Chagas, decidimos tentar o hemocultivo do parasita no meio LIT ("liver infusion tryptose") idealizado por YAEGER e descrito por FERNANDES & col.¹ e por CAMARGO². No presente trabalho são relatados os resultados obtidos com esse processo e o xenodiagnóstico no diagnóstico parasitológico de casos crônicos humanos da doença de Chagas.

MATERIAL E MÉTODOS

I — Meio "LIT"

Foi usado o meio LIT "liver infusion tryptose" líquido e monofásico, constituído de NaCl, KCl, Na₂HPO₄, glicose, triptose, infusão de fígado, hemoglobina e sêro bovino^{2, 7}. O meio era filtrado em Seitz e o pH acertado para 7,2, adicionando-se penicilina e estreptomicina nas concentrações de 50 U/ml e 100 µg/ml respectivamente. O meio era distribuído em tubos de ensaio com 2,5 cm de altura da coluna líquida.

II — Colheita e semeadura do sangue

A) Submetem-se os pacientes com reação de GUERREIRO & MACHADO positiva à punção venosa, colhendo-se 15 ml de sangue com seringa de 20 ml contendo 5 ml de citrato de sódio a 3,8%.

- B) Colocam-se 7 a 8 ml da mistura em dois tubos de centrifugação de 10 ml e centrifuga-se a baixa rotação durante 8 a 10 minutos.
- C) Semea-se o sobrenadante de ambos os tubos, constituído de sôro, plasma, citrato, em 3 tubos com meio "LIT" que recebem a marca SbI, SbII, SbIII; os respectivos sedimentos são semeados em 2 tubos com meio "LIT" designados SdI e SdII.
- D) O volume restante dos 20 ml iniciais, isto é, cerca de 4 ml de sangue total, são distribuídos em 3 tubos contendo o meio "LIT" e rotulados DI, DII, DIII.
- E) Incuba-se a 28°C e examina-se aos 30, 45 e 60 dias após a semeadura, tomando-se 0,10 a 0,15 ml da cultura que são colocados entre lâmina e lamínula e examinados com médio aumento.

III — Xenodiagnóstico

Foram utilizadas, para cada exame, 10 ninfas de 4.º e 5.º estádios de *Triatoma infestans*, criadas em laboratório a partir de ôvo e alimentadas com sangue de galinha ou pombo. As ninfas eram acondicionadas em caixas de papelão recoberta com filó fino, a qual era ajustada, no momento do exame, à face flexora do antebraço dos pacientes e aí deixada durante 40 minutos. O exame dos triatomíneos era realizado após 60 dias, colhendo-se, por compressão abdominal, as fezes que eram homogenizadas com salina e examinadas entre lâmina e lamínula com médio aumento.

Em cada paciente o xenodiagnóstico e a colheita de sangue para hemocultura foram realizadas simultaneamente.

RESULTADOS

Os resultados estão expostos nas Tabelas I e II. Na Tabela I são apresentados os resultados dos xenodiagnósticos e das semeaduras em "LIT" do sangue direto, sobrenadante e sedimento do sangue colhido em 35 pacientes da fase crônica da doença de Chagas. Na Tabela II estão sintetizados os

resultados globais e as percentagens obtidas com o emprêgo dos dois métodos estudados.

DISCUSSÃO

No Brasil, DIAS⁴, em Lassance, submetendo população do setor urbano, não selecionada clinicamente, ao xenodiagnóstico, de 38 casos obtêve 2 positivos, ou seja 5,3%. Em outras 43 pessoas de diversos grupos etários comprovou a infecção em 3 casos, ou seja, 6,9%. Posteriormente, DIAS⁶, trabalhando em Bambuí, em 1.170 xenodiagnósticos realizados obtêve 168 positivos, isto é, 14,3%. Entretanto, o Autor não assinala se casos agudos estão incluídos nestes dados. PEDREIRA DE FREITAS¹³ conseguiu 20,6% de positividade em 1.025 triatomíneos examinados, sendo que em alguns pacientes aplicou simultaneamente 60 insetos e apenas se infetaram 1, 3, 4 e, no máximo, 13 dêles. PIFANO¹⁴, na Venezuela, utilizando o xenodiagnóstico, conseguiu com um só repasto 31,2% e, com dois repastos, 50% de positividade. TORREALBA¹⁵, realizando xenodiagnósticos com *Rhodnius prolixus*, principal transmissor na região, obtêve 25% de positividade. MAEKELT⁹, com a técnica usual, obtêve 16,7% de positividade, e com nôvo procedimento, no qual utiliza um liquidificador para desintegração dos triatomíneos, com posterior homogeneização, filtração, centrifugação e exame com contraste de fase, comprovou 31,6% dos casos. Usando inoculação em camundongos albinos, PEDREIRA DE FREITAS¹¹ obtêve apenas 1 caso positivo entre 144 animais inoculados com sangue humano, ou seja 0,6%. Utilizando "creme leucocitário", obtido de sangue centrifugado, a positividade atingiu 3,1%. Fazendo uso da hemocultura e diferentes meios de cultura, vários Autores conseguiram isolar facilmente o *T. cruzi* na fase aguda (CHAGAS³, GALLIARD⁸, BONACCI¹, DIAS⁴ e PACKCHANIAN¹⁰).

Na fase crônica com a hemocultura os índices percentuais são geralmente baixos. PEDREIRA DE FREITAS¹¹, de 37 semeaduras de casos com reação de GUERREIRO & MACHADO positiva, utilizando os meios de BONACCI e N.N., obtêve resultados negativos levando-o a concluir, com os demais Autores, "da necessidade de sementeiras abun-

dantes⁷. PIFANO¹⁴, em 80 casos, obtêve 5 positivos, isto é, 6,25%; do total de tubos de cultura, 9,7% foram positivos com os meios de DAVIS e RAZGHA-REICHENOW, semeando 1 ml de sangue citratado por tubo. Concluiu PIFANO¹⁴ que a hemocultura não é um método de rotina aplicável à doença de Chagas, e dá preferência ao xenodiagnóstico. Segundo PIFANO a hemocultura teria papel secundário no diagnóstico da doença de Chagas na fase crônica, já que está condicionada a fatores diversos tais como densidade hemoparasitária, potencial macrofágico leucocitário e condições metabólicas adaptativas ao meio. Segundo os nossos dados o sucesso da hemocultura dependeria mais da natureza do meio empregado e da técnica de obtenção do inóculo que daqueles fatores apontados por PIFANO. Os resultados obtidos permitiram obter, com um xenodiagnóstico e uma hemocultura, 42,8% de positividade, devendo ser ressaltada a possibilidade de aumentar ainda mais essa cifra com a repetição dos exames. Note-se que os índices atingidos com o xenodiagnóstico, isto é, 31,4%, concordam com os mais altos índices percentuais já assinalados fora do Brasil (PIFANO¹⁴, MAEKELT⁹).

Como cêrca da metade dos casos comprovados pela cultura já se apresentavam positivos aos 30 dias, quase todos os restantes aos 45 dias e apenas 1 caso foi positivo aos 60 dias, recomenda-se que o exame das hemoculturas se faça 30, 45 e 60 dias após a sementeira do material. Exames realizados antes dos 30 dias foram sempre negativos. Observando-se a Tabela I verifica-se que a maioria dos casos comprovados parasitológicamente pela cultura o foi através da sementeira do sobrenadante (tubos SbI, SbII, SbIII), fato que demonstra que os tripanosomas sobrenadam no sangue citratado.

Algumas das limitações da hemocultura com o meio "LIT" podem ser representadas pela sua preparação mais laboriosa, pela necessidade de filtração em Seitz do sôro e hemoglobina e pela necessidade do emprego de técnica bacteriológica.

Os dois métodos associados, isto é, xenodiagnóstico e hemocultura, permitiram comprovar, como foi exposto, 42,8% dos casos. Esse fato representa elemento extremamente importante na comprovação parasitológica de casos crônicos da doença de Chagas

assim como na avaliação da terapêutica humana dessa enfermidade.

SUMMARY

Contribution to the parasitological diagnosis of human Chagas' disease in the chronic phase

An attempt has been made to improve the parasitological diagnosis of human Chagas' disease in the chronic phase by using xenodiagnosis and hemoculture with "LIT" Yaeger's liquid medium. The hemoculture was performed by inoculating, into different tubes, the whole blood, the supernatant and the sediment of centrifuged blood. From 35 patients with positive complement fixation test, the xenodiagnosis was positive in 31.4% and the hemoculture in 25.7% of the cases; with both methods parasites were detected in 42.8% of the patients.

The Authors emphasize the importance of the association of both methods for parasitological diagnosis and the assessment of drug activity in human chronic Chagas' disease.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Aprígio Salgado, pelo fornecimento dos triatomíneos. À Dra. Antoniana U. Krettli e aos técnicos Ivan Barbosa de Abreu, Cícero de Oliveira e Cícero de Novais, pela ajuda técnica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BONACCI, H. — Nuevo medio de cultivo para el *Trypanosoma cruzi*, Chagas 1909. *Rev. Inst. Bacteriol.* 6:242-247, 1934.
2. CAMARGO, E. P. — Crecimiento e diferenciación em *Trypanosoma cruzi*. I — Origen dos tripanosomas metacíclicos em meio de cultivo líquido. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 6:93-101, 1964.
3. CHAGAS, C. — Nova tripanozomíase humana: estudos sôbre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1:159-218, 1909.

4. DIAS, E. — Xenodiagnóstico e algumas verificações epidemiológicas na moléstia de Chagas. *Novena Reunión de la Soc. Argentina Patol. Reg. Mendoza*, pp. 89-119, 1935.
5. DIAS, E. — Técnica do xenodiagnóstico na moléstia de Chagas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 35:335-342, 1942.
6. DIAS, E. — Acêrca de 254 casos de doença de Chagas comprovados em Minas Gerais. *Brasil Méd.* 5 e 6:3-9, 1946.
7. FERNANDES, J. F. & CASTELLANI, O. — Perspectiva de vacinação contra a moléstia de Chagas. *XVI Reunião Anual SBPC*, Ribeirão Preto, São Paulo, 1964.
8. GALLIARD, H. — Remarques sur la culture de *Trypanosoma cruzi*, Chagas. *Ann. Parasitol.* 7:367-376, 1929.
9. MAEKELT, G. A. — A modified procedure of xenodiagnosis for Chagas' disease. *Amer. J. Trop. Med.* 13:11-15, 1964.
10. PACKCHANIAN, A. — Chagas disease in the United States. *Comunicação ao I Congresso Interamericano de Medicina*. Relatório oficial. Rio de Janeiro, 7 a 15 de setembro, 1946.
11. 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.
12. PEDREIRA DE FREITAS, J. L. — Observações sobre o tempo ótimo para exame de triatomíneos empregados em xenodiagnóstico. *Folia Clin. Biol.* (São Paulo) 16: 180-185, 1950.
13. PEDREIRA DE FREITAS, J. L. — O diagnóstico de laboratório da moléstia de Chagas. *Rev. Clin.* (São Paulo) 28:1-10, 1952.
14. 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.
15. TORREALBA, J. F. — Algo más sobre tripanosomosis. Ensayos de xenodiagnóstico. *Gac. Méd. Caracas* 3:33-36, 1934.

Recebido para publicação em 26/1/1966.