

ISOLAMENTO DE AMOSTRAS DO *TRYPANOSOMA CRUZI* POR XENODIAGNÓSTICO E HEMOCULTURA DE PACIENTES NA FASE CRÔNICA DA DOENÇA DE CHAGAS

ELISABETH BRONFEN, FRANCISCO SILVÉRIO DE ASSIS ROCHA, GISELE BRANDÃO NOGUEIRA MACHADO, MARIA MÁRCIA PERILLO, ALVARO JOSÉ ROMANHA & EGLER CHIARI*

Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ, Caixa Postal 1743, 30190 Belo Horizonte, MG, Brasil

* Departamento de Parasitologia do ICB, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil

Trypanosoma cruzi samples isolation by xenodiagnosis and hemoculture from patients with chronic Chagas' disease – Fifty nine chronic chagasic patients were simultaneously submitted to xenodiagnosis and hemoculture for *Trypanosoma cruzi* samples isolations. The xenodiagnosis was done with 40 *Panstrongylus megistus*, *Triatoma infestans* and *Dipetalogaster maximus* nymphs, performing 120 triatomines. Groups of 10 insects per specie were dissected and the intestinal content pooled and examined, after previous trituration and homogenization. The microscopically negative material was seed into LIT medium and examined after 20 days. Twenty nine patients were parasitologically proved, being 15 only by xenodiagnosis, 4 only by hemoculture and 10 by both methods. It was discussed the parasitological comprovation difficulties in chronic chagasic patients, the value of the simultaneous utilization of different triatomine species in xenodiagnosis and the hemoculture, in a favorable positive association to the sensitivity increase in the diagnosis' disease. The 49.2% of positivity obtained in this group, visualize approaches like clinic-therapeutic assay and or epidemiological (case-control) with the purpose to investigate a possible association with *T. cruzi* samples and different clinic forms in Chagas' disease.

Key words: xenodiagnosis – hemoculture – *Trypanosoma cruzi* isolation

Com o objetivo de isolamento e amplificação de amostras do *Trypanosoma cruzi*, 59 pacientes chagásicos crônicos foram submetidos a xenodiagnóstico e hemocultura concomitantes. O tempo consumido na metodologia tradicional do exame do xenodiagnóstico (Cerisola, 1975), os fatores envolvidos na interação vetor-parasita (Zeledon, 1975) aliados à necessidade de isolamento das amostras diretamente do triatomíneo, levaram-nos a introduzir modificações na sua composição e exame.

MATERIAIS E MÉTODOS

Pacientes – Cinquenta e nove pacientes chagásicos crônicos, em sua maioria nascidos em áreas endêmicas do Estado de Minas Gerais e morando em Belo Horizonte por um período mínimo de quatro anos consecutivos, foram

triados por sorologia anti-*T. cruzi*, com IFI \geq 1:40, em candidatos a doadores de sangue.

Composição do xenodiagnóstico – Cada paciente foi submetido a um xenodiagnóstico constituído de 40 ninfas de 1º estágio de *Dipetalogaster maximus*, 40 ninfas de 3º estágio de *Panstrongylus megistus* e 40 ninfas de 3º estágio de *Triatoma infestans*. Foram aplicadas no braço e antebraço de cada paciente, 12 caixas contendo 10 insetos de cada espécie de triatomíneo. Os triatomíneos que não se alimentaram foram eliminados. Os demais foram incubados em insetário climatizado a 27 ± 1 °C com 70% de umidade.

Exame do xenodiagnóstico – O exame dos triatomíneos de cada xenodiagnóstico foi realizado em torno do 30º dia após o repasto no paciente. No dia do exame, os insetos foram colocados em número de 10 por espécie em 5 ml de solução esterilizante de White (0,25 g de HgCl₂, 6,50 g de NaCl, 1,25 ml de HCl concentrado, 250 ml de etanol a 95% e 750 ml de H₂O) durante 1 h 30 min. De cada ninfa era re-

Trabalho realizado com suporte financeiro do UNDP/WORLD BANK/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical disease (TDR).

Recebido em 23 de setembro de 1988.

Aceito em 28 de fevereiro de 1989.

tirado todo o conteúdo intestinal em condições assépticas e colocado diretamente em tubo de ensaio com 500 μ l de PBS estéril. Um total de 10 conteúdos intestinais/tubo de ensaio foi triturado e homogeneizado com auxílio de bastão de vidro. Uma alíquota de 5 μ l da suspensão foi examinada entre lâmina e lamínula por 200 campos microscópicos de 400 X. Cerca de 250 μ l da suspensão positiva e toda a suspensão negativa foi semeada em tubo de ensaio contendo 2,5 ml de meio LIT preparado de acordo com Camargo (1964) acrescido de 6,6 mg/ml de amplacilina (xenocultura). A xenocultura do material negativo em LIT tinha a finalidade de confirmar ou não a negativação observada a fresco. As xenoculturas foram incubadas a 27 ± 1 °C e examinadas após 20 dias. Os tubos negativos eram desprezados e os positivos semeados em meio LIT para amplificação.

Hemocultura – De cada paciente, foram colhidos 30 ml de sangue venoso com heparina e o plasma separado por centrifugação (600 g/30 min). O sedimento foi lavado uma vez com meio LIT, centrifugado (600 g/20 min), e distribuído em seis tubos de rosca contendo 6 ml de LIT. As culturas foram examinadas após 30, 45 e 60 dias de incubação a 28 °C. Após o último exame, os tubos ainda negativos foram centrifugados a 600 g/15 min e o sedimento examinado.

Infecção dos camundongos – 200 μ l da suspensão do conteúdo intestinal positivo em PBS e igual volume das hemoculturas positivas foram inoculadas intraperitonealmente em camundongos albinos, não isogênicos, machos de ± 20 g e em irradiados com raios gama na dose de 600-650 rads. Foram realizadas nos camun-

dongos hemoculturas em meio LIT logo após o aparecimento de parasitemia no exame a fresco ou no 30º dia após a inoculação, naqueles animais sem parasitemia patente.

RESULTADOS

A Tabela I mostra o desempenho das três espécies de triatomíneos utilizadas nos xenodiagnósticos de 59 pacientes chagásicos crônicos. Este desempenho foi estatisticamente significativo ($X^2 = 763,77$. g.l. = 2) em favor do *T. infestans* como o inseto que sugou em maior número, seguido por *P. megistus* e *D. maximus*. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a positividade das espécies de triatomíneos ($X^2 = 2,58$. g.l. = 2). O *T. infestans* apesar de ter o maior número de insetos examinados revelou igual potencialidade para positivar o xenodiagnóstico ao *P. megistus*, que por sua vez foi igual ao *D. maximus*, inseto com menor número de ninfas examinadas. A xenocultura acresceu somente 1,7% na positividade dos tubos semeados com material negativo ao exame direto.

A Tabela II mostra a comparação do diagnóstico parasitológico em pacientes chagásicos crônicos utilizando-se o xenodiagnóstico com uma, duas e três espécies simultâneas de triatomíneos e hemocultura. Os resultados mostram um acréscimo de cerca de 10% na positividade dos pacientes com a adição de mais uma espécie de triatomíneo no xenodiagnóstico. A positividade da hemocultura foi comparável ao xenodiagnóstico com uma só espécie de triatomíneo. Das 14 hemoculturas positivas, 10 foram também positivas no xenodiagnóstico.

TABELA I

Desempenho das três espécies de triatomíneos utilizadas simultaneamente no xenodiagnóstico de 59 pacientes chagásicos crônicos

Espécie do triatomíneo	Nº de ninfas						
	Aplicadas	Sugaram	Não sugaram	Mortas	Examinadas	Positivas	Positivização (%)
<i>P. megistus</i>	2360	1545	815	165	1380	230	16,7
<i>T. infestans</i>	2360	1326	1034	166	1160	190	16,4
<i>D. maximus</i>	2360	2157	203	67	2090	251	12,0
Total	7080	5028	2052	398	4630	671	14,5

TABELA II

Comparação do diagnóstico parasitológico em pacientes chagásicos crônicos utilizando-se o xenodiagnóstico com uma, duas e três espécies simultâneas de triatomíneo e hemocultura

Número de espécies de triatomíneos usados no xenodiagnóstico			Hemocultura
Uma	Duas	Três	
23,7 (14/59)*	32,2 (19/59)	42,4 (25/59)	24,1 (14/58)

* Numerador = nº pacientes positivos. Denominador = nº pacientes estudados.

A associação da hemocultura com o xenodiagnóstico revelou 30,5 (18/59), 33,9 (20/59) e 49,2% (29/59) de pacientes positivos quando associada com uma, duas ou três espécies de triatomíneo, respectivamente.

DISCUSSÃO

O trato intestinal de triatomíneos é um material muito denso para ser observado apenas com o seu esmagamento entre lâmina e lamínula. A homogeneização e suspensão obtida pela trituração em PBS, conferiu à amostra do material intestinal a ser examinado, uma clarificação que facilitou sua observação ao microscópio. A sementeira do material negativo em meio LIT, por ter contribuído com 1,7% na positividade, além de ter minimizado possíveis erros no diagnóstico final, fortaleceu a segurança do resultado conferido através do exame a fresco do "pool" de tratos intestinais.

A composição do xenodiagnóstico com três diferentes espécies de triatomíneos nos faz refletir sobre o xenodiagnóstico tradicional padronizado por Cerisola (1975). No presente trabalho, se o xenodiagnóstico tivesse sido realizado apenas com o *T. infestans* ou apenas com o *P. megistus*, teriam sido positivos 15 dos 59 pacientes (25,42%). Se o fosse apenas com o *D. maximus*, teriam sido positivos 13 dos 59 pacientes (22,03%). Portanto, 10 pacientes positivos seriam considerados negativos (16,94%). Apesar de não ter havido diferença estatisticamente significativa entre a potencialidade ou susceptibilidade entre as três espécies, o seu emprego simultâneo aumentou a positividade de 23,7% para 42,4%. E se este grupo de pacientes tivesse sido submetido apenas à hemocultu-

ra, a positividade seria igual a 24,1%, percentual semelhante ao que teria sido obtido através do xenodiagnóstico realizado com apenas uma espécie.

Os resultados mostram a dificuldade para isolar o *T. cruzi* em pacientes chagásicos crônicos nos procedimentos do xenodiagnóstico e hemocultura. Os 49,2% de positividade parasitológica obtidos na associação xenodiagnóstico e hemocultura, como já propunham Chiari & Brener (1966), teriam sido menores se utilizados separadamente. Os 10 pacientes que tiveram comprovação simultânea e os quatro que somente foram positivos na hemocultura são resultados intrigantes assim como o fato de não ter sido encontrado nenhum triatomíneo positivo entre os 120 colocados para sugar em cada um dos 30 pacientes não comprovados parasitologicamente, e também os 15 pacientes com uma, duas ou três espécies positivas e a hemocultura negativa.

Deve-se também considerar que este resultado (49,2% de positividade) foi obtido através de apenas um xenodiagnóstico e uma hemocultura por paciente. É possível que esta positividade fosse maior se os 30 pacientes negativos desse grupo fossem submetidos mais vezes a estes procedimentos para isolamento do parasita. Cançado & Brener (1979), estudando a "evolução natural da parasitemia xenodiagnóstico revelável" em pacientes chagásicos crônicos, obtiveram 40% de positividade média em um grupo de 14 pacientes submetidos a 184 xenodiagnósticos seriados. Chiari et al. (1979) realizando hemocultura e xenodiagnóstico com 40 ninfas de *T. infestans* em pacientes chagásicos crônicos de Bambuí (MG) encontraram 55,0% de pacientes positivos na hemocultura enquanto que apenas 27,5% foram positivos no xenodiagnóstico. Provavelmente as amostras de *T. cruzi* do grupo de pacientes de Bambuí devam ser características biológicas e bioquímicas diferentes das amostras isoladas no presente trabalho, procedentes de pacientes de várias regiões do Estado de Minas Gerais.

Enquanto que nas cepas do *T. cruzi* dos pacientes de Bambuí foram encontrados quatro diferentes zimodemas (A, B, C e D) (Romanha et al., 1979; Romanha, 1982), no atual grupo de pacientes foi encontrado somente o zimodema A (Romanha, comunicação pessoal). A baixa parasitemia dos pacientes chagásicos crônicos ou a provável existência de períodos

de ausência de parasitemia durante intervalos variados, provavelmente explicam a baixa sensibilidade do xenodiagnóstico e da hemocultura. Ambos os procedimentos, ao que tudo indica, estão próximos dos seus limites de positividade, quando a nível de 50% (Mourão & Melo, 1975; Chiari & Dias, 1975; Krettli et al., 1984) para se isolar o *T. cruzi* em Minas Gerais.

AGRADECIMENTOS

A Afonso Costa Viana, Orlando Carlos Magno e Oswaldo de Souza Morais pelos trabalhos técnicos de laboratório.

RESUMO

Isolamento de amostras do *Trypanosoma cruzi* por xenodiagnóstico e hemocultura de pacientes na fase crônica da doença de Chagas — Cinquenta e nove pacientes chagásicos crônicos foram submetidos a xenodiagnósticos e hemocultura concomitantes para isolamento de amostras de *Trypanosoma cruzi*. O xenodiagnóstico foi composto de 40 ninfas de *Panstrongylus megistus*, *Triatoma infestans* e *Dipetalo-gaster maximus* num total de 120 triatomíneos. Os insetos foram dissecados em grupo de 10 por espécie e o conteúdo intestinal, agrupado, examinado após prévia trituração e homogeneização. O material negativo ao microscópio foi semeado em meio LIT e examinado após 20 dias. Vinte e nove pacientes foram parasitologicamente comprovados, sendo 15 apenas no xenodiagnóstico, quatro apenas com a hemocultura e 10 por ambos os métodos. Discutem-se as dificuldades para a comprovação parasitológica dos pacientes chagásicos crônicos, o valor da utilização simultânea de diferentes espécies de triatomíneos no xenodiagnóstico e a hemocultura, numa associação positiva favorável ao aumento da sensibilidade para o diagnóstico da doença de Chagas. A positividade de 49,2% obtida neste grupo de pacientes visualiza abordagens do tipo ensaio clínico-terapêutico e/ou epidemiológico (tipo caso-controle) com a fina-

lidade de investigar uma possível associação entre amostras do *T. cruzi* e diferentes formas clínicas da doença de Chagas.

Palavras-chave: xenodiagnóstico — hemocultura — isolamento de *Trypanosoma cruzi*

REFERÊNCIAS

- CAMARGO, E. P., 1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 6: 93-100.
- CANÇADO, J. R. & BRENER, Z., 1979. Terapêutica, p. 362-424. In Brener, Z. & Andrade, Z. *Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- CERISOLA, J. A., 1975. El xenodiagnóstico. In International Symposium on New Approaches in American Trypanosomiasis Research, Belo Horizonte, Brasil.
- CHIARI, E. & BRENER, Z., 1966. Contribuição ao diagnóstico parasitológico da doença de Chagas na sua fase crônica. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 8: 134-138.
- CHIARI, E. & DIAS, J. C. P., 1975. Nota sobre uma nova técnica de hemocultura para diagnóstico parasitológico na doença de Chagas na sua fase crônica. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 9: 133-136.
- CHIARI, E.; DIAS, J. C. P.; LANA, M. & CHIARI, C. A., 1979. Hemoculturas for the parasitological diagnosis of human Chagas' disease in the chronic phase. In Anais do Congresso Internacional sobre Doença de Chagas, Rio de Janeiro.
- KRETTLI, A. U.; CANÇADO, J. R. & BRENER, Z., 1984. Criterion of cure of human Chagas' disease after specific chemotherapy: recent advances. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 79: 157-164.
- MOURÃO, O. G. & MELLO, O. C., 1975. Hemocultura para o diagnóstico parasitológico na fase crônica da doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 9: 183-188.
- ROMANHA, A. J., 1982. *Heterogeneidade isoenzimática em Trypanosoma cruzi*. Tese de Doutorado, UFMG, 110 p.
- ROMANHA, A. J.; SILVA PEREIRA, A. A.; CHIARI, E. & DIAS, J. C. P., 1979. Isoenzyme patterns of *Trypanosoma cruzi* isolated from patients with Chagas' disease. In Anais do Congresso Internacional sobre Doença de Chagas, Rio de Janeiro.
- ZELEDON, R., 1975. Host-parasite relationships in the vector. In International Symposium on New Approaches in American Trypanosomiasis Research. Belo Horizonte, Brasil.