

## TENTATIVA DE ISOLAMENTO PRIMÁRIO DE *T. CRUZI* DE PACIENTES CRÔNICOS DE DOENÇA DE CHAGAS POR HEMOCULTURA — AGENTES BLOQUEADORES —

William Barbosa \*<sup>1</sup>, Ana Cândido Czerewuta \*<sup>2</sup> e Raquel Lopes de Oliveira \*<sup>3</sup>

### RESUMO

Em 250 tentativas de isolamento primário de *T. cruzi*, de pacientes crônicos, foram realizados 04 (quatro) experimentos distintos, de que participaram respectivamente, 100, 100, 30 e 20 pacientes. Nos 03 (três) primeiros experimentos o sangue para hemocultura foi colhido com heparina na proporção de 1 gota/5ml (5000u/5ml). Todos os casos foram cultivados em meio LIT, 130 o foram também em meio 199 mais soro fetal bovino a 30% (SFB 30%) e no meio anterior suplementado com extrato total de barbeiro (*T. infestans*). Todos estes 230 casos foram incubados por 60 dias a 26° C e examinados de 15/15 dias. No último experimento a hemocultura também foi realizada em meio LIT, mas o sangue foi colhido com E.D.T.A. em todos os 20 casos: 10 destes foram lavados antes de inoculados, os outros 10 não foram lavados. A incubação foi feita a 26°C e foi mantida por tempo igual ou superior a 90 dias. Os resultados dos exames foram negativos nos primeiros 230 casos dos 03 (três) primeiros experimentos e foram positivos em 02 (dois) dos 10 casos lavados e em 06 (seis) dos não lavados, colhidos em E.D.T.A. da última experiência. A heparina mostrou-se um agente bloqueador importante para o isolamento do *T. cruzi*, constituindo-se em conjunto com período de tempo de observação do cultivo como os mais importantes fatores para o sucesso ou insucesso do isolamento. Os experimentos realizados com cepas de *T. cruzi*, previamente isolados mostraram que os trypanosomas podem crescer e alguns se mantêm vivos, por períodos tão longos quanto 40 dias em presença de soro imune específico ou não imune, mas com complemento em proporções tão altas quanto 20%, todavia não ultrapassam os 40 dias em cultura na presença de heparina em concentrações iguais à usada para coleta de sangue.

\* Trabalho Parcialmente financiado pelo CNPq Grants n. 2222.8. 169/80.

<sup>1</sup> Professor Titular do Depto. de Medicina Tropical – IPT/UFG.

<sup>2</sup> Professora Assistente do Depto. de Medicina Tropical – IPT/UFG.

<sup>3</sup> Técnica de Laboratório do Depto. de Medicina Tropical – IPT/UFG.

## INTRODUÇÃO

Na doença de Chagas depois do período de latência da fase aguda e logo após alguns dias, torna-se extremamente difícil observar-se parasitas circulantes e o isolamento do agente etiológico é cada vez mais difícil à medida que a doença se cronifica.

Inúmeras tentativas por técnicas de xenodiagnóstico múltiplos e sucessivos (12, 13), com uso de variadas espécies de triatomíneos quase sempre maiores, e em número cada vez maior, visando sugar mais sangue (13) ou com variados meios de cultura, cada vez mais sensíveis, e ultimamente enriquecido com extrato total (8, 16) ou parcial de órgãos de triatomíneos (8) ou enriquecidos com componentes bioquímicos específicos: vitaminas, sais e aminoácidos (1, 3, 4, 10, 11, 12) ou suplementado com meios completos, empregados em cultura de células, seja de mamíferos ou de insetos mais soro fetal bovino, vêm sendo usados até agora com limitados resultados na tentativa do isolamento do *T. cruzi* de pacientes crônicos, seja em amostras únicas ou múltiplas, seriados e seqüenciais de um mesmo paciente (1, 5, 6, 9, 10, 13).

O presente trabalho retrata a nossa experiência neste particular, realizada seja em pacientes de forma crônica sob tratamento específico, ou em controle desse tratamento, de pacientes atendidos na fase aguda, e ainda de pacientes crônicos atendidos, rotineiramente, no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, em Goiânia.

Em face dos resultados apresentados, ele é nada mais que uma nota preliminar pois continuaremos de rotina, em-

pregando os conhecimentos agora adquiridos visando melhorar e confirmar nossos achados.

Este trabalho se desenvolveu ao longo de 04 anos e em virtude do escopo inicial que perseguíamos, a metodologia foi se modificando: visando muitas vezes, confirmar resultados obtidos, instituímos experimentos paralelos que se incorporaram ao trabalho.

## MATERIAL E MÉTODOS

Realizamos tentativa de isolamento de *T. cruzi* em 250 pacientes da forma crônica da doença de chagas e de 10 pacientes da fase aguda como testemunha.

Dos 250 pacientes da fase crônica o primeiro experimento foi realizado em 100 pacientes, as hemoculturas foram executadas, em meio LIT, exatamente, como preconizaram MOURÃO & MELLO. Na ocasião da colheita do sangue foi feito xenodiagnóstico com 40 ninfas de 3º e 4º estágios de *T. infestans* para comparação.

O 2º experimento também foi realizado em 100 pacientes de forma crônica da doença de chagas e nele usamos os seguintes meios: meio LIT isoladamente, meio 199 mais Soro Fetal Bovino (SFB) a 30% e meio 199 mais SFB a 30%, 02 volumes mais extrato de barbeiro, 1 volume – usando respectivamente 4, 5 e 5 tubos com 2ml de meio cada, perfazendo 14 tubos. O inóculo consistiu da interfase, de 10ml de sangue colhido, em "Container" heparinizado, a vácuo, constituído da massa de glóbulos brancos que foi distribuído equitativamente em cada tubo. As culturas foram mantidas por 60 dias a 28°C, quando foram desprezadas.

Dos experimentos suplementares obtivemos os seguintes resultados.

As curvas de crescimento com heparina e sem heparina evidenciaram, uma nítida diferença de crescimento tanto da cepa recém isolada “Cepa Jo-

sé” quanto da cepa “Y”, sendo evidentemente, menor nos meios contendo heparina, e ao cabo de quarenta dias, ao contrário, dos meios sem heparina em que se encontravam os parasitas vivos e em boas condições, estavam todos mortos, naqueles em heparina. FIG. 1.

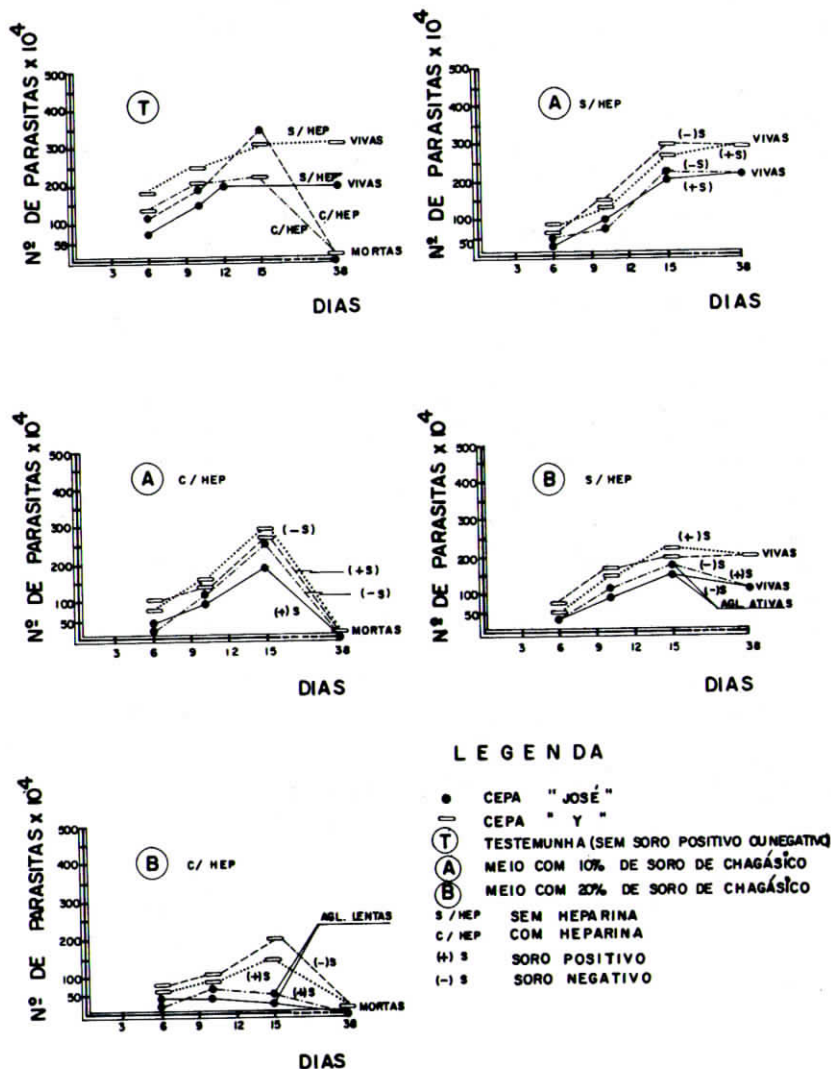


FIGURA I – Curvas de crescimento de *Trypanosoma Cruzi* das cepas “Y” e “José” em Meio LIT com ou sem heparina e/ou soro de chagásico.



O 3º experimento foi realizado em 30 pacientes chagásicos crônicos, a hemocultura foi feita com 10ml de sangue heparinizado, que após centrifugado e lavado com solução fisiológica, teve a papa distribuída equitativamente em 14 tubos de cultura, de meio LIT enriquecidos, 7 tubos com soro fetal bovino (SFB) a 30%, mais meio 199, 2/1 volume, e os outros 7 tubos com o mesmo mais extrato de barbeiro (1 volume de extrato de barbeiro para 2 volumes de 199 \* SFB).

O tempo de cultivo foi de 60 dias, quando foi desprezado. Os exames foram realizados periodicamente de 15 em 15 dias.

O 4º experimento foi realizado em 20 pacientes chagásicos crônicos semeando 14 tubos de LIT, volume final de 5ml. O sangue foi colhido em EDTA 1 gota para cada 5ml.

Em 10 casos o plasma foi retirado e os elementos figurados lavados com soro fisiológico; 0,5ml de papa lavado foi inoculada em 5ml de LIT, e mantidos a 26°C e examinados a cada 30, 45, 60, 75 e 90 ou mais dias com intervalos de mais ou menos 15 dias.

No 2º grupo de 10 casos a massa de elementos figurados não foi lavado, simplesmente o sangue colhido em EDTA 1gt/5ml, o total, foi distribuído, equitativamente, em 14 tubos de cultura em LIT.

O exame periódico do cultivo em todas as investigações foi feita por lâmina corada pelo Giemsa e exame direto, entre lâmina e lamínula.

Em função dos resultados alcançados novos experimentos foram realizados, tentando averiguar a importân-

cia de possíveis fatores bloqueadores exógenos e endógenos impeditores do crescimento do *T. cruzi*.

O 1º experimento em seqüência àqueles quatro básicos iniciais, constou da execução de 02 curvas de crescimento em meio LIT de uma cepa recém-isolada do *Trypanosoma* "Cepa José" isolada neste meio, mas já perfeitamente estabilizada, e da cepa "Y", comparativamente, em que, em uma delas adicionamos heparina em proporção habitualmente empregada na colheita de sangue 5000u/5ml – e a observação de cultivo por 60 dias.

Em outro experimento foi inoculada esta mesma cepa de *T. cruzi*, paralelamente à cepa "Y", inóculo de  $16 \times 10^5$  em duas baterias de 5 tubos de meio LIT, contendo a primeira 10, 20, 30, 40 e 50% de soro chagásico, e a segunda bateria, as mesmas proporções de soro não chagásico e não inativado.

Este experimento foi repetido adicionando-se heparina aos meios de cultura contendo soro.

## RESULTADOS:

No 1º experimento todos os resultados de hemocultura foram negativos até 60 dias e os xenodiagnósticos apresentaram 9% de positividade.

No 2º e 3º experimento todas as hemoculturas foram negativas.

No 4º experimento foram obtidos 8 isolados de *T. cruzi*, 2 dentre os dez (10) casos em que lavamos o sangue colhido do paciente com salina e 6 (seis) no material não lavado.

Os resultados destes experimentos encontram-se resumidos na TABELA 1.

TABELA 1 – Sumário dos experimentos de tentativa de Isolamento em 230 pacientes Chagásicos crônicos comprovados.

| Experimento | Nº de pacientes | Tempo de Cultivo (Dias) | Anti-coagulante | INÓCULO |            | MEIO DE CULTURA |                        |           |                    | Nº de Isolamento |
|-------------|-----------------|-------------------------|-----------------|---------|------------|-----------------|------------------------|-----------|--------------------|------------------|
|             |                 |                         |                 | Lavado  | Não lavado | Lit.            | Lit. + SFB 30% E. Bar. | 199 + SFB | 199 + SFB + E. Bar |                  |
| 1º          | 100             | 60                      | Heparina        | S*      |            | S               |                        |           |                    | 0                |
| 2º          | 100             | 60                      | Heparina        |         | S          | S               | S                      | S         | S                  | 0                |
| 3º          | 30              | 60                      | Heparina        | S       |            | S               | S                      | S         | S                  | 0                |
| 4º          | 10              | ≥ 90                    | Edta            | S       |            | S               |                        |           |                    | 2                |
| 4º          | 10              | ≥ 90                    | Edta            |         | S          | S               |                        |           |                    | 6                |

S \* = Sim; SFB = Soro Fetal Bovino; E. Bar. = Extrato de Barbeiro



Os experimentos realizados com os Trypanosomas da “Cepa José” e “Y” em cujos meios de cultura (LIT) se acrescentou em ordem crescente 10, 20, 30, 40 e 50% de soro específico de paciente chagásico ou soro normal, verificamos que em ambos, houve crescimento razoável dos Trypanosomas, com até 20% dos soros, que se mantiveram vivos até 38 dias.

Nos meios de cultura contendo soros específicos e normal em que se adicionou heparina houve diminuição do crescimento e os parasitas estavam todos mortos com 38 dias.

Nas concentrações maiores a partir do 6º dia, houve o aparecimento predominante de amastigotas e aglutinação dos parasitas que impossibilitava a contagem. TABELA 2.

TABELA 2 – Curvas de crescimento dos Trypanosomas das cepas “Y” e “José” até 38 dias em Meio LIT com Soro Específico e normal na proporção de 10 a 50%.

| Dias do Inóculo | % dos soros e natureza Cepas | 10%      |     |          |     | 20%      |      |          |       | OBSERVAÇÕES  |
|-----------------|------------------------------|----------|-----|----------|-----|----------|------|----------|-------|--|
|                 |                              | Positivo |     | Negativo |     | Positivo |      | Negativo |       |  |
|                 |                              | CH       | SH  | CH       | SH  | CH       | SH   | CH       | SH    |  |
| 6º              | “Y”                          | 133      | 80  | 86       | 76  | 24       | 28   | 54       | 36    | As amostras cultivadas com 30% a 50% de Soros, mostraram-se muito aglutinadas, não permitindo a contagem – Todavia observou-se nas outras culturas com até 30% dos Soros Negativo, bastante leishmanias vivas. Nas outras concentrações com 40% e 50% as leishmanias estavam mortas. |
|                 | “José”                       | 42       | 26  | 36       | 28  | 22       | 24   | 18       | 24    |  |
| 10º             | “Y”                          | 84       | 94  | 120      | 140 | 60       | 86   | 76       | 110   |  |
|                 | “José”                       | 82       | 98  | 88       | 68  | 60       | 80   | 44       | 74    |  |
| 15º             | “Y”                          | 180      | 280 | 240      | 320 | 140      | 186  | 210      | 160   |  |
|                 | “José”                       | 180      | 190 | 260      | 210 | AgM      | AgM* | AgM      | AgM** |  |
| 38º             | “Y”                          | M*       | V** | M        | V   | M        | V    | M        | V     |  |
|                 | “José”                       | M        | V   | M        | V   | M        | V    | M        | V     |  |

M\* = Mortas; V\*\* = Vivas; AgM = Aglutinadas (Movimentos lentos); AgM\* = Aglutinadas (Movimentos menos lentos); AgM\*\* = Aglutinadas (Movimentos bastante ativos); CH = Com Heparina; SH = Sem Heparina.

Este material revisto 38 dias após a inoculação mostrou parasitas vivos e viáveis no meio LIT testemunha, e nos experimentos sem heparina a “Cepa Y” como soro normal apresentava em 1º tubo Trypanosomas vivos e em grande quantidade, e número razoável deles até o 3º tubo que continha 30% de soro humano normal.

Dos casos de fase aguda, todos realizados paralelamente com os experimentos 1, 2, 3 e 4, em número de 17 casos, o *T. cruzi* foi isolado.

## COMENTÁRIOS

Das nossas observações e experimentos pareceu-nos, absolutamente claro, que um dos achados fundamentais, foi a demonstração de que seria muito mais importante a ação bloqueadora da heparina do que a lavagem do inóculo como preconizaram CHIARI & Cols. e outros. Todavia, as observações não são conflitantes: que houve um ligeiro aumento do rendimento da hemocultura na mão daqueles pesquisadores após a lavagem, é inegável, porém esta poderia se dever apenas à remoção da heparina, do inóculo; que outra ação bloqueadora poderia ter elementos celulares e plasmáticos do soro chagásico sobre os parasitas sanguícolas em seu seio – se não uma ação aglutinante.

Mesmo aglutinadas e com aspecto sincicial elas podem continuar evoluindo e voltar à sua forma normal em boas condições de cultivo. ADLER (1958) descreveu o crescimento anormal “in vitro” de *T. cruzi* em grandes massas sensíveis multinucleadas em presença de antisoro específico.

A própria ação lítica sobre epimastigotas de cultura, ela varia de intensidade de cepa para cepa, não é pois constante – Nas nossas experiências concentrações elevadas de até 20% do soro de pacientes chagásicos ou de soro não chagásico sem descomplementar foi incapaz de impedir o crescimento do *T. cruzi*, e permitiu recuperá-los viáveis 38 dias após o inóculo inicial.

Embora tenha sido demonstrado viabilidade aparente de células, imunocompetentes por período de até 6 meses “in vitro”, não identificáveis MINTER GOEDBLOED (1978) e destruição de *T. cruzi* por macrófagos ativados, experimentalmente (HOLF, 1975, MELCHER & COLS, 1976) o fato de isolarmos 6 (seis) de 10 (dez) inóculos completos parece invalidar a hipótese de uma possível atividade de leucócitos inibir o crescimento do *T. cruzi*.

Outro ponto capital para ser levado em consideração é o tempo de cultivo, que exige meio adequado capaz, de permanecer por longo período em condições de permitir a vida do parasita, como o LIT (Yeager, 1976). Isto é necessário porque o rendimento da hemocultura parece crescer proporcionalmente ao tempo, não devendo este ser inferior a 90 dias. A esse respeito vale ressaltar a observação de MINTER GOEDBLOED (1976) que estudou o isolamento do *T. cruzi* por hemocultura de pequenos grupos de pacientes ou animais usando um total de 1 ou 2ml de sangue por indivíduo e somente 0,1 a 0,2ml para cada cultura, e observou que o prolongamento do período de observação para quatro ou cinco meses aumentava o índice de positividade, chegando a 5 culturas positivas dentre 6 pacientes xenopositivos. Fato todavia que



BARBOSA, W.; CZEREWUTA, A. C. e OLIVEIRA, R. L. de. – Tentativa de isolamento primário de *T. Cruzi* de pacientes crônicos de doença de chagas por hemocultura – agentes bloqueadores. *Rev. Pat. Trop.* 12(2): 155-163, maio/jago. 1983.

não se repetiu um ano depois num grupo de 16 pacientes, dos quais só isolou de 7.

### CONCLUSÃO:

Verificamos em 250 tentativas consecutivas de isolamento de *T. cruzi* por hemocultura de chagásicos crônicos que existem fatores bloqueadores até agora insuspeitados, como a heparina e também que anticorpos, complemento e células sensibilizadas, na quantidade em que habitualmente participam do inóculo não interferem no resultado das hemoculturas, pelo menos, na totalidade das cepas circulantes numa dada região, daí não ter nenhuma importância no sentido de aumentar a sensibilidade da hemocultura, retirar-se o plasma e lavar as células, se não quando se usa heparina como anticoagulante. Verificamos também a importância do tempo de cultivo nos resultados da hemocultura que não devem ser inferior a 90 dias.

É provável que a técnica do exame direto acompanhado do controle concomitante de uma lâmina corada pelo Giemsa propicie resultados positivos mais freqüentes, uma vez que, em condições desfavoráveis existe tendência, em muitas cepas a partir do 49 dia de cultivo de se apresentarem como amastigotas – imóveis, ou mesmo cresceram de início independente destas condições, por fatores intrínsecos, como tal.

### SUMMARY:

#### ATTEMPTS OF PRIMARY ISOLATION BY HEMOCULTURE OF *TRYPANOSOMA CRUZI* FROM PATIENTS WITH CHRONIC CHAGAS' DISEASE – BLOCKING AGENTS.

250 attempts of primary isolation of *T. cruzi* from human chronic cases

of Chagas' disease were carried out in four separate trials. The 250 cases were divided into four groups consisting respectively of 100, 100, 30 and 20 patients. In the first three experiments the blood for hemoculture was taken with heparin. One drop of the anticoagulant for 5ml of blood was used. All blood samples were inoculated on LIT culture medium, 130 samples were additionally inoculated on medium 199 plus 30% fetal bovine serum (FBS 30%) and on the former culture medium to which total extract of the bug (*Triatoma infestans*) was added. All these 230 samples were incubated for 60 days, at 26°C and were examined every 15 days. In the last experiment, the hemoculture was also carried out on LIT medium but in these 20 cases all blood samples were taken with EDTA: 10 of these samples were washed before inoculation, the other 10 samples were not washed. Incubation was carried out at 26°C was maintained for at least 90 days. The examinations showed negative results in the first 230 cases of the first three experiments. In the last experiment where blood samples had been collected with EDTA, we observed positive results in two out of the ten samples in which blood was washed and in six out of the ten samples in which blood was not washed. Thus heparin showed to be an important blocking agent in the isolation of *T. cruzi*. The type of anticoagulant used and the time of observation of cultures constitute very important factors for the success or failure in isolation of *T. cruzi*.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ALBUQUERQUE, R. D. R.; FERNANDES, L. A. R.; FUNAYAMA, G. K. FIRRIOLI FILHO, F. & SIQUEIRA, A. F. – Hemoculturas seriadas com meio de

BARBOSA, W.; CZEREWUTA, A. C. e OLIVEIRA, R. L. de. – Tentativa de isolamento primário de *T. Cruzi* de pacientes crônicos de doença de chagas por hemocultura – agentes bloqueadores. *Rev. Pat. Trop.* 12(2): 155-163, maio/jago. 1983.

- Warren em pacientes com reação de Guerreiro-Machado positiva. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 14:1-5, 1972.
02. ADLER, S. – The action of specific serum on a strain of *Trypanosoma cruzi*. *Annals of Trop. Med. and Parasitol.* 52: 282-301, 1958.
03. BONÉ, G. & PARENT, G. – Stearic acid, an essential growth factor for *Trypanosoma cruzi*. *J. Gen. Microbiol.* 31: 261-266, 1963.
04. BRENER, Z. – Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual Review of Microbiology.* 27: 347-382, 1973.
05. CHIARI, E. & BRENER, Z. – Contribuição ao diagnóstico parasitológico da doença de Chagas na fase crônica. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 8: 134-138, 1966.
06. CHIARI, E. & DIAS, J. C. P. – Nota sobre uma nova técnica de hemocultura para o diagnóstico parasitológico da doença de Chagas na sua fase crônica. *Rev. Soc. bras. Med. Trop. São Paulo*, 9: 133-136, 1975.
07. HOFF, R. – Killing in vitro of *Trypanosoma cruzi* by macrophages from mice immunized with *T. cruzi* or BCG, and absence of cross-immunity on challenge in vivo. *Journ. Experimental Med.* 142: 299-311, 1975.
08. HENDRICKS, L. D.; WOOD, E. D. & HAYDUK, M. E. – Haemoflagellates commercially available liquid media for rapid cultivation. *Parasitology* 76: 309-316, 1978.
09. ISOLA, E. L. D.; LAMMEL, U. E.; KETZIN, J. V. & GONZALEZ, CAPPA, M. S. – Influence of organ extracts of *Triatoma infestans* on differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol.* 67(1): 53-58, 1981.
10. MINTER GOEDBLOED, E. – The primary isolation by hemoculture of *Trypanosoma (schizotrypanum) cruzi* from animals and from man. *Trans. Of Royal Soc. of Trop. Med. and Hyg.* 72(1): 22-30, 1978.
11. MOURÃO, O. G. & MELLO, O. C. – Hemoculturas para o diagnóstico parasitológico na fase crônica da Doença de Chagas. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.* 9: 183-188, 1975.
12. NEAL, R. A. & MILLES, R. A. – The sensitivity of culture methods to detect experimental infections of *Trypanosoma cruzi* and comparison with xenodiagnosis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 19: (3) 170-176, maio-junho, 1977.
13. O'DALY, J. A. – A new liquid medium for *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Jour. of Protozool.* 22: 265-270, 1975.
14. PAN, C. T. – Cretivation of the leishmaniform stage of *Trypanosoma cruzi* in cell – media at different temperatures. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 17: 823-832, 1968.
15. PALOMINO, J. C. – Peptone-Yeast Antolyate-Fetal Bovine Serum 10, a simple, inexpensive liquid medium for cultivation of *Leishmania* sp.
16. PIFANO, F. – Evaluacion de los procedimientos de laboratorio empenados em el diagnostico de la enfermedad de Chagas. *Boletim de la Oficina Sanitaria Panamericana.* 49: 563-567, 1960.
17. RASSI, A.; AMATO NETO, V. & OLIVEIRA, R. L. – Observações sobre a hemocultura em meio LIT, para *Trypanosoma cruzi*, segundo MOURÃO & MELLO (1975). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 23(2): 57-60, março-abril, 1981.
18. RUBIO, M. – Actividad lítica de sueros normales sobre formas de cultivo y sanguíneas de *Trypanosoma cruzi*. *Boletim Chileno de Parasitol.* 11:62-68, 1956.
19. WOOD, D. E. and A. C. PIPKEN. – Multiplication and differentiation of *Trypanosoma cruzi* in an insect cell culture system. *Exp. Parasitol.* 24: 176-183, 1969.
20. WOOD, D. E.; A. C. PIPKEN and O. E. SOUZA. – *Trypanosoma cruzi* Effects of *Rhodnius prolixus* extracts on in vitro development. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 18: 93-96, 1976.