
ANÁLISE DE TÉCNICAS PARASITOLÓGICAS UTILIZADAS NO SEGUIMENTO DE PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS E TRATADOS POR MEIO DO TRANSPLANTE CARDÍACO

Lucia Maria Almeida Braz¹, Soraya Kodja Makhoul Dias¹, Erika Gakiya¹, Rita Cristina Bezerra¹, Fátima das Dores Cruz², Silvia Moreira Ayub-Ferreira², Edimar Alcides Bocchi² e Vicente Amato Neto¹

RESUMO

Este estudo teve como objetivo analisar a função da hemocultura, do xenodiagnóstico e do creme leucocitário no acompanhamento e diagnóstico de possível reativação em pacientes crônicos tratados por meio do transplante de coração. Foram examinadas 70 amostras das quais 15,7% (11/70) se mostraram positivas, sendo 8,5% (6/70) na hemocultura e 12,8% (9/70) no xenodiagnóstico. Apresentaram concordância nos dois métodos quatro amostras (36,36%). Não houve positividade no creme leucocitário. Os achados corroboram informações sobre a superior sensibilidade do xenodiagnóstico em relação à hemocultura. A amostra do paciente 20, positiva no xenodiagnóstico (15º dia) e que apresentou miocardite com ninhos de amastigotas 15 dias antes da detecção laboratorial, sinaliza a importância da leitura precoce dos exames parasitológicos como preditivos de possível reativação da doença.

DESCRITORES: Cardiomiopatia chagásica; reativação; xenodiagnóstico; hemocultura; creme leucocitário.

ABSTRACT

Analysis of parasitological techniques in the monitoring of patients with Chagas disease and treated by heart transplantation

This study aimed to evaluate and make a comparison between hemoculture, xenodiagnosis and buffy coat examinations for diagnosis and monitoring of possible re-activation in chronic patients treated by heart transplantation. Seventy samples were analyzed and 15.7% (11/70) were positive:

-
- 1 Laboratório de Investigação Médica (LIM-46 – Parasitologia), do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMTSP-USP), São Paulo, SP, Brasil.
 - 2 Laboratório de Insuficiência Cardíaca e Transplantes, do Instituto do Coração (InCor), Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, Brasil.

Endereço para correspondência: Lucia Maria Almeida Braz, Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 470 CEP 05403-000, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: lmabraz@usp.br

Recebido para publicação em: 23/5/2012. Revisto em: 17/12/2012. Aceito em: 17/3/2013.

8.5% (6/70) in the hemocultures and 12.8% (9/70) in the xenodiagnosis. Four samples were positive in both techniques (5.7%). There were no positive results for the buffy coat examination. These findings support information about the superior sensitivity of xenodiagnosis in relation to hemoculture. Positive xenodiagnosis (day 15) and a myocarditis with nests of amastigotes, 15 days before the laboratory detection, observed in patient sample 20, signals the importance of early reading of indirect parasitological examinations as possible predictors of disease reactivation.

KEY WORDS: Chagas disease; heart transplantation; reactivation; xenodiagnosis; hemoculture; buffy coat.

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é uma doença infecciosa causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* e constitui grave problema de saúde pública (14, 18). A estimativa mais recente do Projeto de Controle de Doenças Prioritárias do NIH e do Banco Mundial indica uma prevalência de 9 a 8 milhões de pessoas infectadas (17). A infecção chagásica caracteriza-se por uma fase aguda, aparente ou não, e uma fase crônica que perdura por toda a vida do paciente. A doença apresenta vários perfis de morbimortalidade, o que gera gastos com internações, transplantes, absenteísmo, licença-saúde, aposentadoria e óbitos precoces (15). Cerca de 30% dos pacientes com doença de Chagas na fase crônica evoluem para a forma cardíaca, que é a forma mais característica da doença (7, 13). O transplante de coração se torna uma opção de tratamento para aqueles pacientes com comprometimento de coração, porém, por ser associado ao uso de imunossuppressores, pode evoluir para episódios de reativação. O “padrão ouro” para avaliação de reativação é a evidência microscópica do parasito no sangue periférico (1, 8). Portanto, é de suma importância que haja um acompanhamento preciso e eficaz com o controle de parasitemia dos pacientes crônicos e imunossuprimidos para evitar rejeições a transplantes e quaisquer outros danos que a reativação da doença possa causar aos sistemas dos indivíduos. Os exames comumente realizados para tal fim são o creme leucocitário e suas variações. Sugere-se que, havendo suspeita de reativação em pacientes com creme leucocitário negativo, seja feita uma investigação de xenodiagnóstico com leituras precoces (5, 12). As técnicas parasitológicas como hemocultura e xenodiagnóstico são reconhecidas como altamente específicas, porém pouco sensíveis na fase crônica. Este trabalho teve como objetivo analisar as técnicas citadas, modificadas, no diagnóstico de possível reativação parasitológica da doença de Chagas em pacientes crônicos, tratados por meio de transplante do coração, e periodicamente acompanhados pelo Laboratório de Insuficiência Cardíaca e Transplantes do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (InCor).

MATERIAL E MÉTODOS

Como rotineiramente ocorre no Laboratório de Investigação Médica – Parasitologia – LIM 46 e no Laboratório de Parasitologia do IMT-USP, foram

examinadas 70 amostras de sangue periférico de 46 pacientes com doença de Chagas tratados por meio de transplante de coração no InCor. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética do IMT-USP e pela CapPESQ sob o nº 0628/08. Estes pacientes, em geral, seguem um protocolo de imunodepressão estabelecido mediante emprego de um inibidor de calcineurina (ciclosporina ou tacrolimo), um antiproliferativo (micofenolato sódico ou azatioprina) e um corticosteróide (prednisona). As técnicas parasitológicas utilizadas para o diagnóstico de possível reativação foram as seguintes: creme leucocitário sem coloração (CL), creme leucocitário corado por laranja de acridina (CLLA) - modelo QBC, hemocultura (HM) e xenodiagnóstico *in vitro* (XD). As amostras foram processadas na forma descrita a seguir.

Creme leucocitário (CL e CLLA)

Dois tubos capilares foram preenchidos com sangue do paciente (~60µL) e, depois de devidamente vedados, centrifugados a 12.000 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, separou-se a porção do creme leucocitário (~10mL) de cada capilar entre lâmina e lamínula (uma lâmina sem corante e outra lâmina contendo corante laranja de acridina). A lâmina com o sangue do paciente sem corante foi minuciosamente examinada em microscópio óptico (400x) e a lâmina com laranja de acridina, em microscópio de fluorescência (1.000x). A técnica de CLLA, adaptação da técnica QBC, é utilizada rotineiramente em nosso laboratório.

Hemocultura (HM)

Aproximadamente 10 mL (4, 15) das amostras dos pacientes foram centrifugadas a 3.500 rpm por 10 minutos. Em seguida, em capela de fluxo laminar, desprezou-se o plasma sem retirar a porção referente ao creme leucocitário. Dividiu-se a amostra total do paciente de forma igual entre HM e XD, sendo reservados 50% do volume do concentrado para a primeira técnica e 50% para a segunda.

Para a HM, foram utilizados dois tubos tipo “Falcon”, de 15 mL, cada um contendo 4 mL de meio LIT. O sangue destinado à HM foi dividido entre os dois tubos, que foram devidamente incubados a 28°C. A leitura dos exames foi realizada em tempo precoce (15 dias) e em tempos convencionais de 30, 60, 90 e 120 dias por meio de observação de alíquota de 10 µL, entre lâmina e lamínula, em microscópio óptico (400x).

Xenodiagnóstico *in vitro* (XD)

Para o XD, foram utilizadas 20 ninfas de *Triatoma infestans* de terceiro e quarto estádios (4, 9). Foi realizado o repasto sanguíneo com sangue do paciente aquecido a 37°C e, posteriormente, as ninfas foram mantidas em estufa a 28°C. Para

a leitura do exame, foi realizada a coprocopia dos insetos por meio de *pool* de fezes, obtidas por compressão abdominal, e exame em microscópio óptico (400x).

RESULTADOS

As 70 amostras sanguíneas analisadas revelaram-se negativas na observação direta (CL/CLLA). Conforme demonstram as Tabelas 1 e 2, 11 amostras (15,7%) foram positivas em alguma técnica parasitológica indireta (XD e/ou HM), sendo 6 positivas na HM (8,5%) e 9 no XD (12,8%). Verificou-se concordância de positividade no XD e HM em quatro pacientes (5,7%).

Tabela 1. Amostras sanguíneas analisadas por creme leucocitário (CL), creme leucocitário com laranja de acridina (CLLA), xenodiagnóstico (XD) e hemocultura (HM)

Amostras	CL	CLLA	XD	HM
04	-	-	(+) 30d	(+) 60d
06	-	-	(+) 60d	-
08	-	-	(+) 60d	-
09	-	-	-	(+) 60d
12	-	-	-	(+) 90d
13	-	-	(+) 30d	(+) 60d
15	-	-	(+) 60d	(+) 90d
20	-	-	(+) 15d	-
42	-	-	(+) 30d	(+) 30d
49	-	-	(+) 60d	-
64	-	-	(+) 60d	-

Tabela 2. Comparação entre as técnicas de hemocultura (HM) e xenodiagnóstico (XD) na detecção de positividade em amostras sanguíneas procedentes de pacientes transplantados com doença de Chagas

	HM (+)	HM (-)
XD (+)	4 / 70	5 / 70
XD (-)	2 / 70	59 / 70

Em relação ao período de análise, a positividade das nove amostras no XD ocorreu do seguinte modo: uma no 15º, três no 30º e cinco no 60º dias. Das seis amostras positivas na HM, uma foi positiva no 30º, três no 60º e duas no 90º. Foram encontradas cinco amostras positivas no XD e negativas na HM. Da mesma forma, duas foram positivas na HM e negativas no XD. Enquanto o XD foi positivo no 30º dia em duas amostras, a HM foi positiva no 60º dia nestas duas amostras. Enquanto o XD foi positivo no 60º dia em uma amostra, a HM foi positiva no 90º na mesma amostra. As duas técnicas apresentaram coincidência de período de positividade em uma amostra no 30º dia.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Creme leucocitário e CLLA

Como foi possível verificar, não houve positividade em nenhuma das 70 amostras pesquisadas nos exames CL e CLLA. A técnica CLLA é uma adaptação da técnica de concentração do creme leucocitário, o Quantitative Buffy Coat (QBC). Para averiguação da reativação da doença em pacientes imunodeprimidos, recomenda-se a técnica de QBC (1, 12). Estudo anterior avaliou o QBC no acompanhamento de pacientes crônicos demonstrando negatividade, ao passo que, pela técnica de XD, houve positividade em 5% destes mesmos pacientes (2).

A fase crônica da doença caracteriza-se por elevados títulos de anticorpos IgG e parasitemia baixa e transitória. Assim, para visualização do parasito em sangue periférico, faz-se necessário o uso de técnicas de crescimento e amplificação como HM e XD (3, 6, 15, 16). Exceção se faz em indivíduos imunodeprimidos, nos quais, ocasionalmente, pode-se encontrar o parasito em exames diretos, indicando possível reativação da doença. Os pacientes do estudo são portadores da doença de Chagas na fase crônica, pós-transplantados, imunossuprimidos e em acompanhamento no Instituto do Coração da Universidade de São Paulo (INCOR) para detecção de possível reativação da doença. No presente estudo, os exames CL e CLLA não detectaram positividade nas 70 amostras analisadas, o que pode sugerir a não ocorrência de reativação nestes pacientes já que a positividade de 11 amostras ocorreu de forma tardia pelo XD e/ou HM, entre 30 e 90 dias. A exceção ocorreu com um paciente que se positivou no 15º dia segundo o XD. Porém, considerando o exame microscópico do CLLA como padrão ouro de reativação da doença, poderíamos concluir que este paciente crônico transplantado e imunossuprimido não apresentou reativação da doença, ou que, diante da subjetividade da técnica direta, de concentração (CL e CLLA), o resultado teria sido mal interpretado.

Hemocultura e xenodiagnóstico

Das 70 amostras estudadas, 11 (15,7%) mostraram-se positivas na HM ou XD, 9 (12,8%) apresentaram-se positivas no XD e 6 (8,5%) foram positivas na HM.

A HM e o XD são técnicas úteis para avaliação da reativação da doença em transplantados, bem como na fase aguda quando o QBC ou exame a fresco são negativos (12). Os resultados obtidos revelam que, em apenas quatro exames, ocorreu positividade em ambas as técnicas (amostras 04, 13, 15 e 42). O XD apontou cinco amostras positivas (que se mostraram negativas em todas as hemoculturas) e, por sua vez, a HM apontou apenas duas amostras positivas que não foram positivas no XD.

São diversos os fatores que podem influenciar a discordância dos dois exames: dificuldade na manipulação de ninfas, contaminação do meio de cultura

inibindo o crescimento do parasito, maior volume de amostra destinada para uma técnica em detrimento da outra, morte de triatomíneos, entre outros. Estas variáveis foram controladas, na medida do possível, por meio da divisão equitativa do volume de sangue entre as duas técnicas, evitando-se a manipulação desnecessária de tubos de cultura e de cubas de triatomíneos pelo uso de fluxo laminar para manipulação de culturas, etc. Ainda com todas estas medidas profiláticas, verificou-se que o XD mostrou-se superior à HM.

Da mesma forma, constatou-se que, em geral, o XD positivou-se antes da HM. Também é possível observar que, quando houve concordância de positividade entre ambas as técnicas, o XD positivou-se uma leitura antes da HM em 75% dos casos (ou seja, três amostras em quatro). Todos estes achados corroboram a hipótese de o XD ser mais sensível, portanto superior à HM. Mas, como o sedimento de hemácias e leucócitos não foi lavado, é possível que a menor taxa de positividade da HM seja devida, em parte, à presença de anticorpos ou mesmo a um complemento na amostra que pode ter lisado as formas epimastigotas, uma vez que estes fatores possivelmente devem ser degradados pelas enzimas digestivas no triatomíneo. Outra possibilidade é que algumas cepas de *T. cruzi* tenham um crescimento fastidioso em cultura. A HM tem como vantagem o isolamento e crescimento do parasito em meio de cultura (6). Para aumentar a sensibilidade da hemocultura, sugere-se a realização de mais leituras, com mais campos microscópios e maior número de tubos por paciente, de modo que seja possível visualizar melhor o parasito, evitando, porém, as contaminações (11).

A positividade de XD e HM em períodos precoces pode evidenciar reativação da doença de Chagas (4, 12). Tomando por base estudo em modelo murino, Braz et al. (2008) propõem antecipar as leituras de XD para um tempo menor que o das leituras tradicionais de 30 e 60 dias após repasto (4), porém faz-se necessária a participação de um número maior de profissionais na atividade. No presente trabalho, o paciente 20 positivou-se na primeira leitura pelo XD, ou seja, evidenciou a presença do parasito em material fecal do triatomíneo 15 dias após a coleta de sangue e execução dos métodos diretos. Desta forma, o resultado precoce em relação às outras amostras seria um indicativo de que o paciente estava em reativação, mesmo tendo os exames diretos CL e CLLA mostrado negatividade. É importante frisar que este paciente tinha uma miocardite com ninhos de amastigotas 15 dias antes da detecção laboratorial da parasitemia. Neste caso, a leitura microscópica precoce (5º ou 10º dias), poderia ter detectado com maior antecedência a positividade, o que ocorreu no 15º dia, período também precoce em relação aos tempos clássicos (30º e 60º dias). É possível observar que, dentre os 11 pacientes com exames HM e/ou XD positivos, quatro foram tratados com benznidazol ou alopurinol porque existiam sinais clínicos sugestivos de reativação. Em casos de reativação e de acordo com a experiência dos clínicos deste grupo, as drogas sugeridas como terapêutica são benznidazol, nifurtimox ou alopurinol, que demonstraram capacidade para enfraquecer a reativação parasitária.

É importante frisar que a definição de reativação não está bem clara, já que ela pode ser clínica ou apenas parasitológica e ainda pode ser confundida com simples parasitemia. Como evidenciam nossos achados, os pacientes citados foram tratados com drogas para reativação, mas após a detecção de sinais clínicos, mesmo sendo negativos os exames de creme leucocitário, padrão ouro para reativação. Portanto, são diversos parâmetros que devem ser analisados, tais como: histórico do paciente, sinais clínicos, alterações cardíacas, possível rejeição, presença do parasito em tecido e miocardite (10). E ainda assim a definição do quadro de reativação parasitológica não pode ser baseado em apenas uma técnica. Cada técnica parasitológica possui suas vantagens e desvantagens e, de forma isolada, podem carecer de sensibilidade, o que leva a resultados falso-negativos ou mal interpretados.

Sendo assim, sugere-se o uso de pelo menos duas técnicas concomitantes com leituras nos períodos iniciais, após repasto sanguíneo e/ou sementeira, de modo que favoreça o diagnóstico precoce de possível reativação, visando uma terapêutica mais eficiente que beneficie o paciente transplantado.

REFERÊNCIAS

1. Amato Neto V, Matsubara L, Lanura PNB. Avaliação do sistema Quantitative Buffy Coat (QBC) no diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*: Estudo em modelo experimental murino. *Rev Soc Bras Med Trop* 29: 59-61, 1996.
2. Amato Neto V, Lopes MH, De Marchi CR, Silva MFS. Tentativa de evidenciar o *Trypanosoma cruzi* no sangue periférico de pacientes com doença de Chagas, em fase crônica, por meio do Quantitative Buffy Coat (QBC). *Rev Soc Bras Med Trop* 31: 231-233, 1998.
3. Avila HA, Pereira JB, Thiemann O, De Paiva E, DeGrave W, Morel CM, Simpson L. Detection of *Trypanosoma cruzi* in Blood Specimens of Chronic Chagasic Patients by Polymerase Chain Reaction Amplification of Kinetoplast Minicircle DNA: Comparison with Serology and Xenodiagnosis. *J Clin Microbiol* 31: 2421-2426, 1993.
4. Braz LMA, Amato Neto V, Carignani FL, Marchi CR. *Trypanosoma cruzi* parasitemia observed in immunocompromised patients: the importance of the artificial xenodiagnosis. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 432: 113-115, 2001.
5. Braz LMA, Amato Neto V, Okay TS. Reactivation of *Trypanosoma cruzi* infection in immunosuppressed patients: contributions for the laboratorial diagnosis standardization. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 50: 65-66, 2008.
6. Castro AM, Luquetti AO, Rassi A, Rassi GG, Chiari E, Galvão LM. Blood Culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 88: 894-900, 2002.
7. Coura JR. Chagas Disease: what is known and what is needed. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 113-122, 2007.
8. Diez M, Favaloro L, Bertolotti A, Burgos JM, Vigliano C, Lastra MP, Levin MJ, Arnedo A, Nagel C, Schijman AG, Favaloro RR. Usefulness of PCR strategies for early diagnosis of Chagas' disease reactivation and treatment follow-up in heart transplantation. *Am J Transplant* 7: 1633-1640, 2007.
9. De Freitas VL, da Silva SC, Sartori AM, Bezerra RC, Westphalen EV, Molina TD, Teixeira AR, Ibrahim KY, Shikanai-Yasuda MA. Real-time PCR in HIV/*Trypanosoma cruzi* coinfection with and without Chagas disease reactivation: association with HIV viral load and CD4+ level. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1277, 2011.

10. Kalil J, Bocchi EA, Cunha-Neto E. Transplante De coração para Tratamento da Miocardiopatia Chagásica. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Netto M. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Ed. Guanabara Koogan. 2ª. Ed. Rio de Janeiro: 2000. p.431.
11. Kirchhoff LV, Votava JR, Ochs DE, Moser DR. Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. *J Clin Microbiol* 34: 1171-1175, 1996.
12. Luquetti AO, Rassi A. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: Brenner, Z.; Andrade, Z.A.; Barral-Netto, M. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. 2ª Ed. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro: 2000.
13. Marin-Neto JÁ, Simões MV, Sarabanda AVL. Forma Crônica Cardíaca In: Brenner, Z.; Andrade, Z.A.; Barral-Netto, M. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. 2ª Ed. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro: 2000.
14. Ministério da Saúde. Doença de Chagas. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1530> Acesso em: 10/jan/2013.
15. Portela-Lindoso AAB, Shikanai-Yasuda MA. Doença de chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. *Rev Saúde Pública* 37: 107-115, 2003.
16. Ramirez JD, Guhl F, Umezawa ES, Morillo CA, Rosas F, Marin-Neto JA, Restrepo S. Evaluation of Adult Chronic Chagas Heart Disease Diagnosis by Molecular and Serological Methods. *J Clin Microbiol* 47: 3945-3951, 2009.
17. Schoffield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol* 22: 583-588, 2006.
18. Vinhaes MC, Dias JCP. Doença de Chagas no Brasil. *Cad Saúde Pública* 16: 7-12, 2000.