

# *Trypanosoma cruzi*, hemocultura: uma abordagem prática\*

## *Trypanosoma cruzi*, hemoculture: a practical approach

Rita Cristina Bezerra<sup>1</sup>, Vicente Amato Neto<sup>2</sup>

\*Recebido do Laboratório de Investigação Médica - Parasitologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP.

### RESUMO

**JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS:** A hemocultura permanece útil para diagnosticar a doença de Chagas crônica. O objetivo deste estudo foi comparar a técnica “clássica” e a “modificada” mais usada para essa finalidade no Brasil.

**MÉTODO:** A inoculação de “creme leucocitário” com sedimento de sangue centrifugado caracteriza ambas as técnicas. Amostras provenientes de dois grupos de 137 pacientes chagásicos crônicos foram examinadas. A “clássica” utiliza 10 mL de sangue; a “modificada”, 30 mL.

**RESULTADOS:** A técnica “modificada” mostrou-se mais sensível do que a “clássica”.

**CONCLUSÃO:** Sugere-se o uso rotineiro da técnica “modificada”.

**Descritores:** Culturas de *Trypanosoma cruzi*, Doença de Chagas crônica, Parasitemia de baixo nível, Técnica de cultura “modificada”.

### SUMMARY

**BACKGROUND AND OBJECTIVES:** Hemoculture remains a valuable tool for the diagnosis of chronic Chagas disease. We tested the two techniques routinely used in Brazil.

**METHOD:** The “modified” technique includes the inoculation of “buffy coat” and centrifuged blood sediment from

a 30 mL sample, the serum being washed out after centrifugation and replaced by equal volume of culture medium; the “classic” one requires the inoculation of centrifuged blood sediment plus “buffy coat” from a 10 mL sample.

**RESULTS:** A higher sensitivity of the “modified” technique was observed when the results of two samples of 137 chronic Chagas disease patients were compared.

**CONCLUSION:** The routine use of the “modified” technique should be preferred.

**Keywords:** Chronic Chagas disease, Low level parasitemia, Modified culture technique, *Trypanosoma cruzi* culture.

### INTRODUÇÃO

No Brasil, a cultura de sangue ainda permanece útil para diagnosticar a doença de Chagas crônica, por ser caracterizada por baixos níveis de parasitemia e altos títulos de anticorpos. Exames diretos de sangue são ineficazes nestes casos. Preferem-se então as provas sorológicas<sup>1</sup>. Tradicionalmente, durante esta fase os exames recomendados para evidenciação de parasitas viáveis no sangue periférico são cultura e xenodiagnóstico<sup>2-4</sup>. Ambos consistem na transferência de amostras de sangue para um meio adequado à multiplicação dos parasitas.

Pequena quantidade de exemplares viáveis de *T. cruzi* produzirá uma população desses parasitas suficiente para sua detecção no volume de líquido a ser observado sob o microscópio. Em condições ideais, a composição do meio usado deverá oferecer ao *T. cruzi* um ambiente pelo menos tão favorável à sua multiplicação quanto o encontrado no tubo digestivo do vetor.

Em condições ideais, um exame negativo significará ausência de exemplares viáveis de *T. cruzi* na amostra inoculada. Avaliações confiáveis das características de sensibilidade das técnicas de cultura e de suas fontes de variação aguardam ainda uma investigação fundamental.

Um resultado positivo, obtido de volume pequeno de sangue, torna desnecessária nova colheita. Importante vantagem da cultura e do xenodiagnóstico: por dependerem de um processo natural de replicação de material genético, produzem exames positivos que indicam necessariamente a presença de parasitas viáveis na amostra.

1. Bióloga, Pesquisadora do Laboratório de Investigação Médica - Parasitologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil

2. Médico, Chefe do Laboratório de Investigação Médica - Parasitologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil

Apresentado em 12 de março de 2010

Aceito para publicação em 24 de maio de 2010

Endereço para correspondência:

Dr. Vicente Amato Neto

Av. Doutor Enéas de Carvalho Aguiar, 470 – Cerqueira César  
05403-000 São Paulo, SP.

E-mail: amatonet@usp.br

As culturas ainda hoje são solicitadas aos laboratórios de parasitologia e constituem ainda um campo adequado para pesquisa.

A Reação em Cadeia da Polimerase (RCP), o processo de identificação de material genético ou *Polymerase Chain Reaction* (PCR)<sup>5</sup>, introduzida recentemente na prática laboratorial, permite identificar vários tipos de material biológico, entre eles espécies de parasitas. No momento há fatores limitantes para sua aplicação em rotina do laboratório clínico: complexidade, suscetibilidade de contaminação e alto custo em termos de instalações e equipamento.

A cultura de *T. cruzi*, ainda é objeto de frequentes investigações, porém sua sensibilidade ainda não está bem definida. As fontes de variação dos seus resultados não foram suficientemente analisadas; podem fazer variar amplamente sua sensibilidade. Segundo o estudo de Portela-Lindoso e Shikanai-Yasuda<sup>6</sup> as percentagens de culturas positivas podem situar-se entre 0% e 94% quando usadas diferentes técnicas. Há, entretanto, concordância dos autores quanto a alguns aspectos: o uso do meio *Liver Infusion Tryptose* (LIT)<sup>7</sup> e, sempre que possível inóculo de 30 mL; se necessário, repetir o exame; reduzir do intervalo de tempo entre a colheita e a inoculação; manter as culturas à temperatura de 28° C, bem como aumentar o tempo de observação.

Duas das técnicas em uso corrente: a “clássica”, descrita por Chiari e Brener<sup>8</sup> e a “modificada” foram comparadas quanto à sensibilidade, tendo-se em vista a adoção de uma delas na rotina laboratorial. Ambas obedeceram as prescrições dos autores, porém quanto à técnica “modificada”, foi adotado um valor mais alto de G e durante as lavagens do sedimento e tomadas as precauções para preservar o “creme leucocitário”. Estas precauções não estavam incluídas nas descrições da técnica.

O objetivo deste estudo foi comparar a técnica “clássica” e a “modificada” mais usada para essa finalidade no Brasil.

## MÉTODO

A técnica “clássica” prescreve a colheita de 10 mL de sangue e, para evitar possível interferência da centrifugação na viabilidade dos parasitas, recomenda-se a inoculação imediata. Foram cultivados dois conjuntos de 156 amostras de

sangue de pacientes com doença de Chagas crônica. Cada amostra foi distribuída em dois tubos de 15 mL, cada um contendo 4 mL de meio LIT. A técnica “modificada”<sup>10</sup> prescreve o uso de amostras de 30 mL de sangue centrifugadas a 1507 x G durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Desprezado o plasma, o volume inicial foi reconstituído com meio LIT e feita nova centrifugação. Ao sedimento lavado, contendo o creme leucocitário, acrescentou-se meio LIT para obter o volume total de 24 mL, distribuído em seis tubos de 15 mL.

A lavagem do sedimento é indicada para remover imunoglobulinas anti-*T. cruzi* possivelmente contidas no plasma. O material das culturas “clássicas” foi distribuído em quatro tubos de 15 mL. Após intervalos de 15, 30, 60, 90 e 120 dias, retiravam-se alíquotas de 10 µL de material correspondente a ambas as técnicas, para exame ao microscópio.

## RESULTADOS

Os resultados obtidos e as distribuições das frequências em ambos os casos estão expostos nas tabelas 1 e 2. A técnica “modificada” demonstrou sensibilidade consideravelmente maior do que a “clássica”.

## DISCUSSÃO

Modificações aparentemente simples de um processo de laboratório podem contribuir para expressivas melhoras de rendimento e consequentes ganhos em resultados. O experimento ora em discussão foi elaborado para servir de apoio para uma tomada de decisão com duas escolhas de significado inegável.

## CONCLUSÃO

Sugerem-se estudos mais pormenorizados sobre a preparação de inóculos e dos meios de cultura para tornar mais sensíveis as técnicas de cultura. Sabe-se que, com o uso de uma só técnica, o número de positivos é indicador de sensibilidade apenas quando é baixa a parasitemia, isto é quando a existência de pelo menos um exemplar do parasita no inóculo é revelada pelo processo de cultura.

Tabela 1 – Resultados obtidos com o uso da técnica “clássica” e a “modificada”

Hemoculturas	Positiva	Negativa	Total
Clássica	20 (12,8%)	136 (87,2%)	156
Modificada	41 (26,3%)	115 (73,7%)	156

Tabela 2 – Distribuição das frações de sangue positivo obtidas após centrifugação (1507 x G).

Volume de Sangue	Nº Positivo	Sedimento	“Crema Leucocitário”	Plasma
30 mL	41	37 (90%)	4 (10%)	0

## REFERÊNCIAS

1. Chieffi PP, Amato-Neto V. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi*. São Paulo: Scortecci Digital; 2000. p. 29
2. Bronfen E, de Assis Rocha FS, Machado GB, et al. Isolation of *Trypanosoma cruzi* samples by xenodiagnosis and hemoculture from patients with chronic Chagas' disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 1989;84(2):237-40.
3. Chiari E, Dias JC, Lana M, et al. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. Rev Soc Bras Med Trop 1989;22(1):19-23.
4. Mourão OG, Chiari E. Comprovação parasitológica na fase crônica da doença de Chagas por hemoculturas seriadas em meio "LIT". Rev Soc Bras Med Trop 1975;9(5):215-9.
5. Gomes ML. *Trypanosoma cruzi*: otimização da reação em cadeia da polimerase (PCR) no diagnóstico da doença de Chagas crônica e caracterização molecular de cepas isoladas de pacientes chagásicos crônicos no noroeste da Paraná [Resumo de Tese] Rev Soc Bras Med Trop 1998;31(3):327-8.
6. Portela-Lindoso AA, Shikanai-Yasuda MA. Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction. Rev Saude Publica 2003;37(1):107-15.
7. Rassi A, Amato Neto V, de Oliveira RL. Hemoculture in the LIT medium for *Trypanosoma cruzi* according the Mourão-Mello method (1975). Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1981;23(2):57-60.
8. Chiari E, Brener Z. Contribution to the parasitological diagnosis of human Chagas' disease in its chronic phase. Rev Inst Med Trop São Paulo 1966;8(3):134-8.
9. Luz ZM. Changes in the hemoculture methodology improve that test positivity. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999;94(Suppl 1):295-8.
10. Luz ZM, Coutinho MG, Cançado JR, et al. Hemoculture: sensitive technique in the detection of *Trypanosoma cruzi* in chagasic patients in the chronic phase of Chagas disease. Rev Soc Bras Med Trop 1994;27(3):143-8.