

HEMOCULTURAS SERIADAS COM O MEIO DE WARREN EM PACIENTES COM REAÇÃO DE GUERREIRO MACHADO POSITIVA

Rosa D. R. ALBUQUERQUE⁽¹⁾, Luiz Augusto R. FERNANDES⁽²⁾, Gentilda K. FUNAYAMA⁽¹⁾, FRANCISCO FERRIOLLI F.⁽²⁾ e Astolpho Ferraz de SIQUEIRA⁽²⁾

RESUMO

Empregando o meio de Warren, semeando seis amostras de sangue colhidas diariamente, em duas séries mensais, os Autores isolaram tripanosomas em 37 de 38 casos crônicos de moléstia de Chagas. Com uma nova série de exames foi conseguida a taxa de 100% de positividade. Computando apenas as três primeiras amostras foram revelados 34 casos, ou seja, 89,5% dos casos. Os resultados das duas séries se equivaleram. 46,4% dos resultados positivos foram revelados aos 15 dias da semeadura.

Os Autores consideram êsses achados como sendo de importância fundamental para novos estudos sobre a moléstia de Chagas e prometeram dados mais pormenorizados sobre outros aspectos do trabalho que ainda não foram concluídos.

INTRODUÇÃO

A demonstração de tripanosomas no sangue é a maneira mais adequada para o diagnóstico parasitológico da moléstia de Chagas. Todavia, os métodos de laboratório mais usados para o diagnóstico na fase crônica da moléstia como o xenodiagnóstico, a inoculação em animais e a hemocultura, ainda não deram resultados satisfatórios. O xenodiagnóstico que é o método mais empregado, tem mostrado, em geral, índices baixos de positividade: DIAS⁵, PIFANO¹³, PEDREIRA DE FREITAS⁶, TORREALBA¹⁶. Entretanto, resultados mais promissores têm sido conseguidos com o emprêgo de grande número de triatomíneos, com a repetição dos exames e com a introdução de novas técnicas para o exame dos triatomíneos aplicados: MAECKELT⁸, CHIARI & BRENER³, SCHENONE & col.¹⁴, MARSDEN & col.⁹. A hemocultura é ainda, na opinião da maioria dos Autores, um método menos sen-

sível que o xenodiagnóstico. Os referidos nos trabalhos mais antigos são realmente muito precários: NOGUCHI¹⁰, GALLIARD⁷, BONACCI², PEDREIRA DE FREITAS⁶, CRAIG⁴, PACKCHANIAN¹⁵. Porém, resultados bem melhores têm sido obtidos com a introdução de novos meios de cultura: WALTON & col.¹⁷, OLSEN & col.¹¹, CHIARI & BRENER³, ALBUQUERQUE¹. Aliás, CHIARI & BRENER³ sugerem que o sucesso da hemocultura dependeria mais da natureza do meio empregado e da técnica de obtenção do inóculo.

O trabalho de ALBUQUERQUE, empregando o meio de Warren para o isolamento de tripanosomas de animais de laboratório com infecção crônica, mostrou resultados muito animadores. As facilidades para a preparação deste meio, a possibilidade de usá-los após a esterilização em autoclave sem os inconvenientes da adição de sangue ou sôro fresco,

Trabalho realizado no Laboratório de Parasitologia, do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

- (1) Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.
(2) Laboratório de Parasitologia, Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Brasil

tornam-no a nosso ver um meio muito adequado para a prática de hemocultura nos casos de moléstia de Chagas. No presente trabalho relatamos os primeiros resultados de hemoculturas seriadas com êste meio em pacientes com reação de Guerreiro Machado positiva.

MATERIAL E MÉTODO

1) Preparação do meio Warren

Dissolver 37 g de Brain Heart Infusion (Difco ou Oxoid) em 1.000 ml de água destilada. Aquecer até a fervura, juntar 10% de sangue de carneiro desfibrinado. Agitar e deixar coagular. Filtrar e refiltrar no mesmo papel de filtro. Distribuir alíquotas de 5 ml em tubos previamente esterilizados. Conservar em geladeira.

2) Seleção dos pacientes

Os pacientes estudados foram selecionados dentre os que procuraram o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e que apresentaram reação de fixação do complemento positivo pela técnica "quantitativa" de FREITAS e ALMEIDA.

3) Colheita e semeadura do sangue

Com os devidos cuidados de assepsia, foram colhidas amostras de 3 ml de sangue por punção venosa. O sangue era imediatamente transferido para tubos contendo 0,5 ml de Lique mine Roche em solução a 6 por mil, previamente esterilizados em autoclave durante 20 minutos a 120°C. De cada paciente foram colhidas 9 amostras em 3 séries com intervalo de 30 dias, 3 dias sucessivos para cada série, à semelhança do esquema seguido por SCHENONE & col.¹⁴. De cada amostra foram semeadas alíquotas de 0,2 ml para 14 tubos que continham 5 ml do meio.

4) Exame dos tubos semeados

Os tubos foram examinados 15, 30 e 45 dias após a semeadura. Aos 15 e aos 30 dias, o conteúdo de cada tubo era colhido com alça de platina, espalhado em lâmina e examinado com objetiva 10 X e ocular 10 X, sem o auxílio da lamínula. Aos 45 dias, os tubos eram centrifugados por 10 minutos a 2.000 r.p.m. (Centrífuga Internacional n.º II) e de cada tubo era examinada uma gota do sedimento com os mesmos aumentos referidos mas com o auxílio de lamínula.

RESULTADOS

Neste trabalho estamos apresentando apenas os resultados que se referem aos dados obtidos com as duas primeiras séries de amostras de cada caso. Também incluímos os casos que não completaram as duas séries mas que tiveram resultados positivos na primeira série. Êstes resultados estão apresentados no Quadro I.

Pela observação do Quadro I podemos verificar que: 1) A hemocultura foi positiva em 37 dos 38 pacientes submetidos, no máximo, a duas séries de exames, 97,4%. O único caso negativo nas duas primeiras séries foi positivo quando submetido à terceira série de exames; 2) Considerando apenas os resultados referentes à primeira série de cada caso, podemos verificar que 34 dos 38 casos foram positivos, 89,5%; 3) Comparando os resultados da 1.ª série com as da 2.ª série de cada paciente podemos verificar que não houve diferença significativa entre as duas, pois a primeira revelou 22 e a segunda 20 resultados positivos, nos 26 casos que completaram as duas séries.

DISCUSSÃO

Dos resultados que conhecemos do uso da hemocultura em pacientes crônicos da moléstia de Chagas, os de CHIARI & BRENER³ são os mais importantes. Com uma única amostra de sangue de cada paciente, cerca de 12 ml, semearam 8 tubos contendo o meio LIT e obtiveram 9 casos positivos em 35 estudados, 25,7%. Semeando uma única amostra de cada paciente, 3 ml de sangue repartidos em 14 tubos com o meio de Warren, obtivemos a média de 19 resultados positivos em 38 estudados, 50%. É importante chamar a atenção para o fato de que 46,4% destes resultados positivos foram revelados aos 15 dias da semeadura, enquanto que no trabalho citado, nenhum exame resultou positivo dos 30 dias.

Apesar da dificuldade de compararmos os resultados da hemocultura com os do xenodiagnóstico, achamos interessante fazer um paralelo dos nossos achados com os conseguidos por SCHENONE & col.¹⁴ em casos selecionados pela reação de fixação de complemento. Aplicando 42 triatomíneos, 14 em

ALBUQUERQUE, R. D. R.; FERNANDES, L. A. R.; FUNAYAMA, G. K.; FERRIOLLI Filho, F. & SIQUEIRA, A. F. de — Hemoculturas seriadas com o meio de Warren em pacientes com reação de Guerreiro Machado positiva. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 14:1-5, 1972.

QUADRO I

Resultados obtidos em 38 casos crônicos de moléstia de Chagas, submetidos à Hemocultura com o meio de Warren

AMOSTRAS DE SANGUE					1ª SÉRIE									2ª SÉRIE								
Nº	Ident.	Reg.	Sexo	Idade	I			II			III			I			II			III		
					15	30	45	15	30	45	15	30	45	15	30	45	15	30	45	15	30	45
1	JFF	108 168	M	53	N	P	-	N	N	P	P	-	-	P	-	-	P	-	-	P	-	-
2	JJP	92 526	M	47	P	-	-	N	P	-	N	N	N	P	-	-	N	N	N	N	P	-
3	BJS	113 296	M	41	N	N	N	N	P	-	P	-	-	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4	VP	113 441	M	50	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	O	O	O	O	O	O
5	BPO	116 701	M	50	N	N	N	P	-	-	P	-	-	N	P	-	N	N	N	N	N	N
6	OEJ	109 766	M	60	N	N	N	P	-	-	P	-	-	P	-	-	P	-	-	N	P	-
7	CHSP	95 708	F	36	P	-	-	P	-	-	P	-	-	P	-	-	P	-	-	P	-	-
8	JCL	111 457	M	51	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	-	-	P	-	-	N	N	N
9	JRC	27 376	M	46	N	N	P	N	P	-	P	-	-	O	O	O	O	O	O	O	O	O
10	ASJ	111 843	M	26	N	N	N	P	-	-	P	-	-	N	N	P	N	P	-	P	-	-
11	ESC	50 607	F	40	N	N	N	P	-	-	P	-	-	O	O	O	O	O	O	O	O	O
12	TJS	109 274	F	26	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	P	-	-	P	-	-
13	AP	92 429	M	36	N	N	N	N	P	-	N	N	N	O	O	O	O	O	O	O	O	O
14	JDS	113 234	M	42	N	N	N	N	P	-	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
15	QTC	75 163	F	45	N	N	P	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	P	N	N	N
16	JMS	114 853	M	35	N	N	P	N	N	P	N	N	N	O	O	O	O	O	O	O	O	O
17	MAT	18 977	F	56	N	N	P	P	-	-	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N
18	WG	100 723	M	33	P	-	-	N	N	N	N	N	P	O	O	O	O	O	O	O	O	O
19	ELS	91 473	M	45	N	N	P	N	N	N	N	P	-	N	N	N	N	N	N	N	P	-
20	RF	115 264	M	27	N	N	P	P	-	-	P	-	-	N	N	P	N	N	P	N	P	-
21	EP	77 667	M	51	N	N	N	P	-	-	P	-	-	N	N	N	P	-	-	P	-	-
22	NS	92 928	M	42	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
23	JFS	103 460	M	47	N	N	P	N	N	N	N	N	N	P	-	-	P	-	-	N	P	-
24	HTF	115 683	M	45	N	N	P	N	N	P	N	P	-	N	N	N	N	P	-	N	P	-
25	LAJ	28 450	F	21	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
26	LHM	94 621	F	33	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	P	-	N	N	N	N	N	N
27	JP	ñ tem	M	62	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	-	-	N	N	N	N
28	RVP	ñ tem	F	49	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
29	OCS	113 198	M	55	N	P	-	P	-	-	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N
30	AL	115 393	M	32	N	N	N	P	-	-	N	N	N	O	O	O	O	O	O	O	O	O
31	GPS	105 545	M	36	N	P	-	N	N	N	N	N	N	O	O	O	O	O	O	O	O	O
32	ORSL	74 441	F	27	N	P	-	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
33	RCB	61 102	F	36	N	N	N	N	N	N	P	-	-	N	N	N	N	P	-	N	P	-
34	RMT	35 226	F	48	N	P	-	P	-	-	N	N	N	O	O	O	O	O	O	O	O	O
35	LOM	91 833	F	44	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	-	-	N	N	N	N	N	N
36	SRP	80 900	F	25	N	N	N	N	N	N	N	N	P	O	O	O	O	O	O	O	O	O
37	MSL	ñ tem	F	30	N	N	N	N	P	-	N	P	-	O	O	O	O	O	O	O	O	O
38	RAS	118 267	F	47	N	P	-	N	N	N	N	N	N	O	O	O	O	O	O	O	O	O

N = negativo P = positivo O = não realizado - - = não examinado

cada dia, êsses Autores referem o encontro de parasitas em 69,1% dos pacientes. No nosso trabalho, considerando apenas as amostras dos três primeiros dias, a sementeira de 42 tubos com 200 mg de sangue, 14 em cada dia, permitiu mostrar a parasitemia em 89,5% dos casos.

A comprovação parasitológica pela hemocultura seriada em 100% de casos considerados crônicos é sem dúvida um achado de importância fundamental. A comprovação da persistência da parasitemia e a demonstração do valor do diagnóstico específico pela reação de fixação do complemento pela técnica de FREITAS e ALMEIDA são dois corolários importantes dos resultados apresentados. As perspectivas do estudo da avaliação do efeito terapêutico de drogas específicas são as mais animadoras.

Resta ainda do prosseguimento dêste trabalho, uma tentativa da medida da parasitemia quando tivermos feito o seguimento completo dos pacientes com a computação do número de tubos positivos referentes às várias amostras sementeiras. Outros problemas como a importância da natureza do meio empregado, da proporção de sangue semeado, do número de tubos empregados, e outros assuntos correlatos estão sendo investigados.

SUMMARY

Serial haemocultures in Warren's medium from patients with a positive Guerreiro-Machado's test

Three series, each consisting of three blood samples collected in successive days, were obtained at monthly intervals from chronic cases of Chagas Disease. Haemocultures were carried out in Warren's medium.

In the first series of haemocultures 34 out of 38 cases, or 89.5 per cent, gave positive results; the first and second series combined revealed 37 out of 38 cases, or 97.4 per cent; no significant differences were observed between the results of the two series. With an additional third series the percentage of positivity rose to 100 per cent.

The preliminary data now presented seems of extraordinary importance for the study of Chagas Disease. Further details will be given

when the results up to, now obtained will be complemented and fully analyzed.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBUQUERQUE, R. D. R. — *Estudo comparativo entre o valor dos xenodiagnósticos seriados e o das culturas de sangue e de triturados de órgãos para diagnóstico da tripanossomose americana experimental na fase crônica*. Tese. Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto, 1968.
2. BONACCI, H. — Nuevo medio de cultivo para el *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909. *Rev. Inst. Bact.* 6:242-247, 1934.
3. CHIARI, E. & BRENER, Z. — Contribuição ao diagnóstico parasitológico da doença de Chagas na sua fase crônica. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 8:134-138, 1966.
4. CRAIG, C. F. — *Laboratory Diagnosis of Protozoan Diseases*. Philadelphia, Lea & Febiger, 1942.
5. DIAS, E. — Xenodiagnóstico e algumas verificações epidemiológicas na moléstia de Chagas. *Novena Reunión de la Soc. Argentina Patol. Reg. Mendoza* pp. 89, 119, 1935.
6. FREITAS, J. L. P. — *Contribuição para o estudo do diagnóstico da Moléstia de Chagas por processos de laboratório*. Tese. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1947.
7. GALLIARD, H. — Culture des trypanosomes et en particulier *T. inopinatum* en milieu liquide sucré. *Ann. Parasit. Hum. Comp.* 7: 248, 1929.
8. MAECKELT, G. A. — A modified procedure of xenodiagnosis for Chagas' disease. *Amer. J. Trop. Med.* 13:11-15, 1964.
9. MARSDEN, P. D.; PRATA, A.; SARNO, P.; SHERLOCK, I. A. & MOTT, K. — Some observations on xenodiagnosis with *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* in human infections with Bahian strains of *Trypanosoma cruzi*. *Trans. Soc. Trop. Med. Hyg.* 63:425-426, 1969.
10. NOGUCHI, H. — Isolation of *Leptospira icteroides* from case of yellow fever in the interior of Bahia. *Monogr. Rockefeller Inst. Med. Res.* 20:9, 1924.
11. OLSEN, P. F.; SHOEMAKER, J. P.; TURNER, H. F. & HAYS, K. L. — Incidence of *Trypanosoma cruzi* (Chagas) in wild vectors and Reservoirs in East Central Alabama. *J. Parasitol.* 50:599-603, 1964.

ALBUQUERQUE, R. D. R.; FERNANDES, L. A. R.; FUNAYAMA, G. K.; FERRIOLLI Filho, F. & SIQUEIRA, A. F. de — Hemoculturas seriadas com o meio de Warren em pacientes com reação de Guerreiro Machado positiva. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 14:1-5, 1972.

12. PACKCHANIAN, A. — Infectivity of the Texas as strain of *Trypanosoma cruzi* to man. *J. Trop. Med.* 23:310-314, 1943.
13. 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 animais sensibles. *Arch. Venez. Patol. Trop. Parasitol. Med.* 2:146-151, 1954.
14. SCHENONE, H.; ALFARO, E.; REYES, H. & TANCHER, E. — Valor del xenodiagnóstico en la infección chagásica crónica. *Bull. Chil. Parasitol.* 23:149-153, 1968.
15. TALICE, R. V. — *Enfermedades parasitarias*. Montevideo, Ed. Científica del Sindicato Médico del Uruguay, 1944.
16. TORREALBA, J. F. — Algo más sobre tripanosomosis. Ensayos del xenodiagnóstico. *Gac. Med. Caracas* 3:33-36, 1934.
17. WALTON, B. C.; BAUMAN, P. M.; DIAMOND, L. S. & HERMAN, C. M. — *Trypanosoma cruzi* — like in racoons from Maryland. *J. Parasitol.* 42 (Suppl.):20, 1956.

Recebido para publicação em 12/5/1971.