

## MÉTODO SIMPLES DE ENRIQUECIMENTO PARA EVIDENCIAR TRIPANOSOMAS NO SANGUE

Maria Paumgartten DEANE e Elfriede KIRCHNER

### RESUMO

Como o *Trypanosoma cruzi* e o *T. conorhini* mostram-se mais resistentes que as hemácias a um meio hipotônico, estas podem ser destruídas seletivamente pela adição de água ao sangue parasitado. Esses flagelados puderam ser demonstrados facilmente, com finalidade diagnóstica, em exames de sangue, bem como se obteve a concentração dos parasitos ativos e viáveis para cultura ou inoculação em camundongos.

A lise diferencial tem sido utilizada para isolar certas células, eliminando outras presentes no meio e que sejam ou se tornem indesejáveis.

Tendo observado uma diferença de resistência entre as hemácias de rato ou de camundongo e as formas sangüícolas do *Trypanosoma cruzi* e do *T. conorhini* em presença de soluções hipotônicas, conseguimos, após algumas experiências, estabelecer um método de grande simplicidade que permite evidenciar aquêles protozoários quando a parasitemia é baixa.

Centrífuga, tubos apropriados, frascos de Erlenmeyer, pipetas graduadas, água destilada e solução de cloreto de sódio a 17:1000 — é todo o material necessário. A amostra de sangue deve ser colhida com anticoagulante.

O método consiste em:

1. Colocar num frasco de Erlenmeyer 1 ml do sangue a examinar;
2. Adicionar 9 ml de água destilada e, imprimindo ao frasco movimentos de

rotação, homogeneizar rapidamente a mistura;

3. Adicionar imediatamente 10 ml da solução hipertônica de ClNa e tornar a homogeneizar a mistura;
4. Passar para tubos afunilados e centrifugar a 2000-2500 rpm, durante 15 minutos;
5. Recolher o sedimento para exame.

O sedimento é constituído de estroma dos glóbulos vermelhos lisados, pequena quantidade de glóbulos não lisados, leucócitos e tripanosomas. Se fôr considerado necessário, um segundo "choque" de água destilada sobre o sedimento, repetindo os tempos e conservando as proporções em volume referidas acima, acarretará a lise de praticamente a totalidade das hemácias, deixando ainda os leucócitos e tripanosomas intactos.

Os tripanosomas conservam-se muito móveis. Para o exame a fresco aconselhamos que a preparação seja deixada em repouso por uns poucos minutos sobre a platina do

tam e os tripanosomas serão vistos com maior microscópio: os restos de hemácias sedimentam-se, ao focalizar o microscópio, nos lembrarmos de sua tendência a subir de encontro à face inferior da lamínula.

Além da aparência normal após o tratamento descrito, os tripanosomas mantêm-se viáveis, infectantes para camundongos e cultiváveis em meios de ágar sangue. Essas observações são válidas tanto para o *T. cruzi* como para o *T. conorhini*.

Prolongando o tempo de permanência em contacto com a solução hipotônica (i.é, água destilada mais plasma e conteúdo das hemácias lisadas), verificamos que um número progressivamente maior de tripanosomas vai sendo destruído, mas até o fim do período máximo experimentado — 10 minutos — ainda persistem formas íntegras e infectantes.

Nos ensaios que fizemos, o método demonstrou-se muito bom, permitindo rápido encontro de tripanosomas até mesmo em animais dos quais diversas preparações de sangue haviam sido negativas ao exame direto comum.

Para diagnóstico em casos humanos poderá ser colhida maior quantidade de sangue e o processo repetido em várias amostras de 1 ml, ou com amostras maiores, conservando-se as quantidades de água e de salina hipertônica dentro das proporções mencionadas. Nossa experiência indica ainda que a obtenção de culturas se torna mais fácil a partir do sedimento do sangue hemolisado. Isto será devido não só a um maior número

de tripanosomas no inóculo como, provavelmente, ao fato de que este estará livre de anticorpos. Como é óbvio, para obter culturas, ter-se-á que trabalhar com esterilidade.

#### SUMMARY

##### *A simple concentration method to demonstrate trypanosomes in blood.*

The method is based on the finding that red blood cells are lysed much more rapidly than the parasites if distilled water is added to the blood. It is as follows: over 1 ml of the sample (with anticoagulant) in an Erlenmeyer's flask, pour 9 ml of distilled water; rotate the flask rapidly and add 10 ml of a 17 per thousand solution of NaCl; rotate the flask again, pass the mixture to adequate tubes and centrifuge at 2,000-2,500 rpm, for 15 minutes. If the sediment is still rich in whole erythrocytes a second "shock" with distilled water will bring complete lysis.

Trials were made with the blood of animals infected with *T. cruzi* and with *T. conorhini*. Trypanosomes were easily found even when several blood preparations made in the usual manner had been negative. The parasites remain very active and their viability has been proven through inoculations in mice and culture media.

Recebido para publicação em 15 outubro 1962.