

## ESTUDO DA SUSCETIBILIDADE DE DIFERENTES ESPÉCIES DE TRIATOMÍNEOS (HEMIPTERA: REDUVIIDAE) AO *Trypanosoma cruzi* CHAGAS (KINETOPLASTIDA: TRYPANOSOMATIDAE)

Ionizete G. Silva<sup>1</sup>, Hideki Nakano<sup>1</sup>, Heloisa H.G. Silva<sup>1</sup> e Rejane Nakano<sup>1</sup>

### ABSTRACT

Susceptibility of Different Species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) with the *Trypanosoma cruzi* Chagas (Kinetoplastida: Trypanosomatidae)

The susceptibility of different Triatominae species was investigated by applying xenodiagnosis in mice during acute *Trypanosoma cruzi* Chagas infection (Y strain). Twenty individual for each species were offered infected mice. Each bug was examined individually. The susceptibility was studied considering the following parameters: the number of positive triatomine, and number of trypanosoma eliminated by spontaneous dejections. Species susceptibility in relation to the number of positive triatomine were: *Dipetalogaster maximus* Uhler; *Triatoma rubrovaria* (Blanchard); *T. infestans* (Klug); *Rhodnius nasutus* Stål; *T. dimidiata capitata* Usinger; *R. neglectus* Lent; *R. prolixus* Stål; *R. robustus* Larrousse. According to the number of eliminated trypanosomes susceptibility of triatomine species were in decreasing order: *D. maximus*; *R. nasutus*; *T. rubrovaria*; *R. prolixus*; *R. neglectus*; *T. d. capitata*; *T. infestans* and *R. robustus*.

KEY WORDS: Insecta, american tripanosomiasis, photoperiod, xenodiagnosis.

### RESUMO

Estudou-se a suscetibilidade das espécies de triatomíneos: *Dipetalogaster maximus* (Uhler), *Rhodnius nasutus* Stål, *R. neglectus* Lent, *R. prolixus* Stål, *R. robustus* Larrousse, *Triatoma dimidiata capitata* Usinger, *T. infestans* (Klug) e *T. rubrovaria* (Blanchard) em relação à cepa Y de *Trypanosoma cruzi* Chagas. Aplicaram-se, em camundongos com infecção aguda, 20 triatomíneos de cada espécie, examinados individualmente, para estimar a suscetibilidade. Esta foi avaliada através de dois parâmetros: número de triatomíneos infectados e número de tripanosomas excretados. O primeiro mostrou a seguinte ordem de suscetibilidade das espécies de triatomíneos: *D. maximus*, *T. rubrovaria*, *T. infestans*, *R. nasutus*, *T. dimidiata capitata*, *R. neglectus*, *R. prolixus* e *R. robustus*. De acordo com o segundo parâmetro, a suscetibilidade das espécies em ordem decrescente foi: *D. maximus*, *R. nasutus*, *T. rubrovaria*, *R. prolixus*, *R. neglectus*, *T. d. capitata*, *T. infestans* e *R. robustus*.

PALAVRAS-CHAVE: Insecta, tripanosomíase americana, fotoperíodo, xenodiagnóstico.

Recebido em 27/09/93. Aceito em 27/10/94.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Goiás (UFG), Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTESP), Departamento de Parasitologia, Caixa postal 131, 74001-970, Goiânia, GO.

## INTRODUÇÃO

Apesar da grande especificidade do xenodiagnóstico para a infecção chagásica, a sua sensibilidade é considerada baixa em relação aos exames sorológicos e isto tem estimulado estudos na tentativa de melhorar a sensibilidade desse exame. Dentre estes, a busca da espécie de triatomíneo mais suscetível ao *Trypanosoma cruzi* Chagas, para ser utilizada como modelo experimental, tem sido uma das alternativas (Perlowagora-Szumlewicz et al. 1988, Silva et al. 1993, Silva & Silva 1993).

A utilização do xenodiagnóstico como método parasitológico, tanto para diagnosticar e selecionar pacientes para tratamento etiológico da doença de Chagas quanto para demonstrar a parasitemia circulante em chagásicos que se encontram em tratamento com drogas tripanosomicidas, tem aumentado a sua importância e o seu uso na experimentação terapêutica. Geralmente, se inicia o tratamento apenas quando se dispõe do exame parasitológico positivo. Após o tratamento, a negatividade do xenodiagnóstico tem sido um evidenciador da eficiência quimioterápica (Gould et al. 1967, Reboosolán 1969, Salgado 1969, Schenone et al. 1969, Cerisola et al. 1977).

O xenodiagnóstico utiliza como meio de cultura, "in vivo", os triatomíneos. Por esta razão, estudou-se a suscetibilidade de espécies silvestres, *Dipetalogaster maximus* Uhler e *Rhodnius robustus* Larrousse; em processo de adaptação ao domicílio humano, *R. nasutus* Stål, *R. neglectus* Lent e *Triatoma rubrovaria* (Blanchard) e, domiciliado, *R. prolixus* Stål, *T. dimidiata capitata* Usinger e *T. infestans* (Klug), em relação à cepa Y de *T. cruzi*, na busca da espécie de triatomíneo mais adequada para replicar este flagelado, com a finalidade de usá-la em rotina no xenodiagnóstico. A utilização dessas espécies de triatomíneos, teve como objetivo, verificar a associação entre os hábitos nos diferentes ecótopos com a replicação do tripanosoma. Utilizou-se a cepa Y de *T. cruzi* por ser a mais bem estudada e ter excelente infectividade para animais de laboratório.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os triatomíneos foram criados numa câmara biológica à temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $70 \pm 5\%$  e fotoperíodo de 12 h. A criação dos triatomíneos foi de acordo com a técnica de Silva (1985). Foram inoculados, por via intraperitoneal, 20 camundongos machos albinos isogênicos, da linhagem A/Sn, com cerca de cinco semanas de vida, com  $1,0 \times 10^5$  formas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. No 8º dia após a inoculação, seccionou-se a extremidade da cauda do camundongo, colheu-se 5 µl de sangue com um micropipetador automático e contou-se o número de tripanosomas circulantes pelo método usado por Brener (1961), com adaptação de Silva & Ferreira (1990). Imediatamente após a contagem de tripanosomas, realizou-se o xenodiagnóstico. Para isto, cada camundongo foi imobilizado numa tela de náilon, de acordo com Silva & Ferreira (1990), e afixado aos tubos, através de elásticos, contendo um triatomíneo de cada espécie, possibilitando um permanente contato com a fonte de alimentação. As leituras do xenodiagnóstico foram realizadas aos 30, 60, 90, 120 e 150 dias após a aplicação do exame, pela técnica das dejeções espontâneas (Silva 1990). Esta técnica permite examinar separadamente, tanto as fezes quanto a urina, para isto é fundamental que o triatomíneo atinja a repleção total (Silva & Silva 1989). Testaram-se oito espécies, com 20 triatomíneos de cada uma, em jejum absoluto, sendo que usou-se *D. maximus* no 1º estágio, dez dias após a eclosão das ninfas; *T. d. capitata*, *T. infestans* e *T. rubrovaria*, 12 dias após a ecdisse do 2º estágio e, *R. nasutus*, *R. neglectus*, *R. prolixus* e *R. robustus*, 15 dias após a ecdisse do 3º estágio. A suscetibilidade foi estimada através de dois parâmetros: número de triatomíneos infectados e

número de tripanosomas excretados.

## RESULTADOS

A eliminação de tripanosomas pelos triatomíneos oscilou de uma leitura a outra. Nos cinco meses de estudo, após a infecção dos triatomíneos, verificou-se que a eliminação de *T. cruzi* foi significativamente maior ( $P < 0,05$ ) nos 2º e 3º meses, em todas as espécies (Tabela 1). Este resultado é de grande importância para o xenodiagnóstico, mostrando perspectivas para melhorar a sensibilidade desse exame, sugerindo uma leitura aos 60 dias, para exames de rotina, e aos 60 e 90 dias (período mais fácil de detecção do tripanosoma) para estudos de suscetibilidade.

Tabela 1. Número de *Trypanosoma cruzi* ingeridos e dejetados por triatomíneos, estimado pelo xenodiagnóstico.

Espécies	Nº médio de <i>Trypanosoma cruzi</i> em 5 µl					
	Ingeridos (sangue)	Excretados (fezes)/leituras (dias)				
		30	60	90	120	150
<i>Dipetalogaster maximus</i>	93.806	7.143	12.371	15.702	9.907	12.145
<i>Rhodnius nasutus</i>	240.610	890	2.464	6.620	1.032	2.615
<i>Triatoma rubrovaria</i>	662.140	690	1.750	4.370	2.337	3.322
<i>Rhodnius prolixus</i>	342.590	09	1.477	1.951	420	398
<i>Rhodnius neglectus</i>	326.610	07	215	1.170	139	221
<i>Triatoma dimidiata</i>	1.641.943	02	779	286	02	317
<i>Triatoma infestans</i>	744.312	47	398	539	238	24
<i>Rhodnius robustus</i>	344.988	880	439	80	08	05

A suscetibilidade foi avaliada por dois parâmetros: número de triatomíneos infectados e o número de *T. cruzi* excretados. A suscetibilidade avaliada pelo primeiro parâmetro (Fig. 1), encontra-se na seguinte ordem: 1º - *D. maximus*, 2º - *T. rubrovaria*, 3º - *T. infestans*, 4º - *R. nasutus*, 5º - *T. d. capitata* e *R. neglectus*, 6º - *R. prolixus* e 7º - *R. robustus*. Pelo segundo parâmetro (tripanosomas excretados - Tabela 1), a ordem de suscetibilidade foi a seguinte: 1º - *D. maximus*, 2º - *R. nasutus*, 3º - *T. rubrovaria*, 4º - *R. prolixus*, 5º - *R. neglectus*, 6º - *T. d. capitata* e *T. infestans*, 7º - *R. robustus*, pela análise da variância, ao nível de 5%.

## DISCUSSÃO

A utilização do xenodiagnóstico para confirmação ou acompanhamento da parasitemia, em pacientes que se encontram em tratamento específico para a doença de Chagas, tem motivado estudos para melhorar a sensibilidade deste exame. Na busca da espécie mais adequada ao xenodiagnóstico, diversos estudos foram realizados com triatomíneos em relação a suscetibilidade destes ao *T. cruzi*. Os resultados de diversos autores têm mostrado

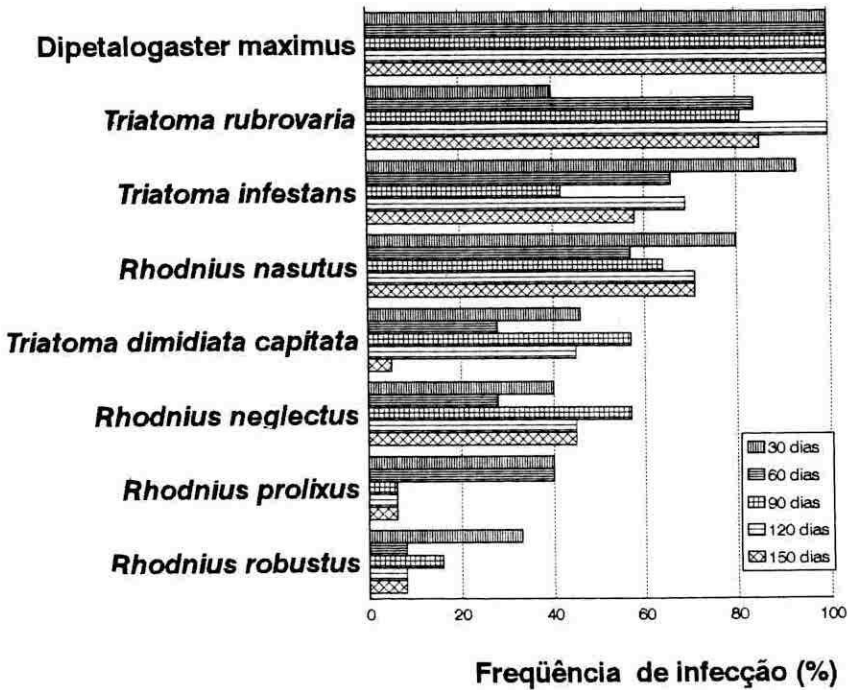


Figura 1. Frequência (%) de triatomíneos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*, pelo xenodiagnóstico, aplicado em camundongos com infecção aguda.

heterogeneidade e às vezes, antagonismos. Dentro deste contexto, um grupo mostrou que era maior a suscetibilidade das espécies de triatomíneos da mesma região das cepas do *T. cruzi* do que as das espécies exóticas (Dias 1915, Ryckman 1965, Little *et al.* 1966, Cerisola *et al.* 1971). Os resultados obtidos por Zeledón & Vieto (1957) e, deste trabalho, com *D. maximus*, *T. rubrovaria* e *R. nasutus*, são discordantes e inversos dos anteriores. Torres (1915), mostrou que os índices de infecção pelo *T. cruzi* cresciam com os estádios ninfais dos triatomíneos. Entretanto, Phillips & Bertran (1967) encontraram uma relação inversa; posteriormente, Neal & Miles (1977) verificaram que não havia uniformidade quanto aos índices de infecção pelo *T. cruzi*, quando a quantidade ingerida de sangue era alta, e Miles *et al.* (1975), Mello & Chiarini (1980), Silva & Ferreira (1990), Silva & Silva (1993) e neste trabalho, mostraram que o sangue ingerido não era fator determinante na infecção de triatomíneo. Isto pode ser observado com *D. maximus* (Tabela 1) que ingeriu a menor quantidade de sangue e de *T. cruzi* e, no entanto, eliminou a maior quantidade de tripanosomas, apresentando-se como o melhor modelo experimental. O oposto ocorreu com *T. d. capitata* que ingeriu cerca de  $1,6 \times 10^6$  formas de tripanosomas, eliminando apenas duas formas na leitura realizada aos 30 dias.

Outro aspecto relevante no estudo da suscetibilidade é a relação das formas tripomastigotas finas e largas das cepas de *T. cruzi* e a infecção dos triatomíneos. Brener (1971) verificou que os triatomíneos se infectavam melhor com as cepas em que predominavam as formas largas. Foi utilizada neste trabalho, a cepa Y de *T. cruzi*, na qual predomina as formas tripomastigotas finas, e a opção foi pelo desafio que esta oferecia em desenvolver menor infecção nos

triatomíneos e possibilitar, pelo menos teoricamente, melhor avaliação da suscetibilidade.

Outro estudo relevante, relaciona-se com as técnicas de leituras coproscópicas dos triatomíneos para o conhecimento da suscetibilidade. Silva (1990) mostrou que a técnica das dejeções espontâneas era mais eficiente para detectar o tripanosoma do que a da compressão abdominal, apresentando as seguintes vantagens: não utiliza solução salina para diluição do material fecal, examina, além das fezes, a urina, sem traumatismo ou morte do inseto, detectando uma maior quantidade de tripanosomas (Silva *et al.* 1993). Usando-se, neste trabalho, a técnica das dejeções espontâneas, verificou-se que as espécies *D. maximus*, *R. nasutus* e *T. rubrovaria*, foram os melhores meios de cultura "in vivo" para replicar o *T. cruzi*.

A fonte de infecção pode ser mais uma variável no estudo da suscetibilidade de triatomíneos ao *T. cruzi*. Sherlock & Almeida (1973) mostraram que as espécies domiciliadas eram mais suscetíveis ao *T. cruzi*, quando infectadas em cão e tatu. Perlowagora-Szulemwitz *et al.* (1988) verificaram maior suscetibilidade em espécies silvestres infectadas em cobaio. Neste trabalho, usando-se camundongo isogênico A/Sn, constatou-se que as espécies silvestres *D. maximus*, *R. nasutus* e *T. rubrovaria* foram as mais suscetíveis.

As citações, evidenciam vários fatores associados à suscetibilidade de triatomíneos ao *T. cruzi*. Neste trabalho, estudando-se as variáveis: infecção das espécies de triatomíneos, sangue ingerido, tripanosomas ingeridos e excretados, evidenciou-se *D. maximus* como o melhor modelo experimental.

#### LITERATURA CITADA

- Brener, Z.** 1961. Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas. Tese de livre docência, Fac. Odont. Far. Minas Gerais, Belo Horizonte, 99p.
- Brener, Z.** 1971. Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 13: 171-178.
- Cerisola, J.A., R.W. Rhowedder & C.E. del Prado.** 1971. Rendimiento del xenodiagnóstico en la infección crónica humana utilizando ninfas de diferentes especies de triatomíneos. Bol. Chil. Parasit. 26: 57-58.
- Cerisola, J.A., N.N. da Silva, A. Prata, H. Schenone & R. Rohwedder.** 1977. Evaluación mediante xenodiagnóstico de la efectividad del nifurtimox en la infección chagásica crónica humana. Bol. Chile. Parasit. 32: 51-62.
- Dias, E.** 1940. Xenodiagnósticos seriados em cães infectados com amostras venezuelanas de *Schizotrypanum cruzi*. Bras. Med. 54: 859-861.
- Gould, R.M., G.R. da Silva & H. Rocha.** 1967. Repeated xenodiagnosis in chronic Chagas' disease: Effect of a single injection of Prednisole. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 9: 84-89.
- Little, J.W., J. Tay & F. Biaggi.** 1966. A study on the suscetibility of triatominae bugs to some Mexican strains of *Trypanosoma cruzi*. J. Med. Entomol. 3: 252-255.
- Mello, D.A. & C. Chiarini.** 1980. Suscetibilidade dos diferentes estádios evolutivos de

- Triatoma sordida* (Stål, 1859) e de *Rhodnius neglectus* Lent, 1954, à infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Rev. Bras. Biol. 40: 327-334.
- Miles, M.A., J.W. Patterson, P.D. Marsden & M.D. Minter. 1975.** A comparison of *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* in the xenodiagnosis of a chronic *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* infection in a *Rhesus monkey* (*Macaca mulata*). Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 69: 377-382.
- Neal, R.A. & R.A. Miles. 1977.** The numbers of trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* required to infect *Rhodnius prolixus*. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 19: 177-181.
- Perlowagora-Szumlewicz, A., C.A. Müller & C.G. Moreira. 1988.** Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas' disease. 3 - On the interaction of vector species and parasite strain in the reaction of bugs to infection by *Trypanosoma cruzi*. Rev. Saúde Púb. 22: 390-400.
- Phillips, N.R. & D.S. Bertran. 1967.** Laboratory studies of *Trypanosoma cruzi* infections in: *Rhodnius prolixus* - larvae and adults; in: *Triatoma infestans*, *T. protacta* and *T. maculata* - adults. J. Med. Entomol. 4: 168-174.
- Rebosolán, J.B. 1969.** Sensibilidad de los métodos de diagnóstico parasitológico en pacientes con enfermedad de Chagas aguda tratados con Bay 2502. Bol. Chile Parasit. 24: 49-51.
- Ryckman, R.E. 1965.** Epizootiology of *Trypanosoma cruzi* in South western North America. V. Host parasite specificity between *Trypanosoma* and Triatominae (Kinetoplastida: Tripanosomatidae) (Hemiptera: Triatominae). J. Med. Entomol. 2: 96-99.
- Salgado, A.A. 1969.** Consideraciones sobre metodología y sensibilidad del xenodiagnóstico. Cent. Pesq. René Rachou, Inst. End. Rurais 9-13.
- Schenone, H., L. Concha, R. Aranda, A. Rojas & E. Alfaro. 1969.** Experiencia terapéutica con el Bay 2502 en la infección chagásica crónica del adulto. Importancia del uso adecuado del xenodiagnóstico. Bol. Chile Parasit. 24: 66-69.
- Silva, I.G. da. 1985.** Influência da temperatura na biologia de triatomíneos. I. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera: Reduviidae). Rev. Goiana Med. 31: 1-37.
- Silva, I.G. da. 1990.** Nova técnica para a leitura do xenodiagnóstico. Rev. Goiana Med. 36: 35-39.
- Silva, I.G. da & I.R. Ferreira. 1990.** Influência da fonte sanguínea na multiplicação da cepa "Y" de *Trypanosoma cruzi* em *Triatoma infestans* (Klug, 1834) e *Rhodnius neglectus* Lent, 1954. Rev. Goiana Med. 36: 41-48.
- Silva, I.G. da & H.H.G. da Silva. 1989.** Influência da temperatura na biologia de triatomíneos. IX. *Rhodnius nasutus* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 84: 377-382.

- Silva, I.G. da & H.H.G. da Silva. 1993.** Suscetibilidade de 11 espécies de triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae) à cepa "Y" de *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Rev. Bras. Entomol. 37: 459-463.
- Silva, I.G. da, A.O. Luquetti & H.H.G. da Silva. 1993.** Importância do método de obtenção das dejeções dos triatomíneos na avaliação da suscetibilidade ao *Trypanosoma cruzi*. Rev. Soc. Brasil Med. Trop. 26: 19-24.
- Sherlock, I.A. & S.A. Almeida. 1973.** Diferença de suscetibilidade à infecção com *T. cruzi* entre espécies de triatomíneos alimentados em cão, tatu e camundongo infectados. Rev. Soc. Brasil. Med. Trop. 7: 87-98.
- Torres, M. 1915.** Alguns fatos que interessam a epidemiologia da moléstia de Chagas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 7: 120-136.
- Zeledón, R. & P.L. Vieto. 1957.** Susceptibilidad de varias espécies de triatomíneos a una cepa costarricense de *Schizotrypanum cruzi*. Rev. Biol. Trop. 5: 195-199.
-