

PRIMEIRO ENCONTRO DE *TRITOMA TIBIAMACULATA* PINTO, 1926 NATURALMENTE INFECTADO POR *TRYPANOSOMA CRUZI* NO MUNICÍPIO DE UBATUBA, SÃO PAULO

Gentilda K. F. TAKEDA (1), Flávio E. MOREIRA (2), Theophilo de Barros REAES (3) e
Marcos L. S. CASTANHO (3)

RESUMO

Os Autores relatam o encontro do primeiro exemplar de *Triatoma tibiamaculata* em Ubatuba, São Paulo, que, ao exame do material de sua ampola retal apresentou formas tripomastigotas. O estudo da amostra por inoculação em camundongos brancos jovens revelou 100% de infecção, período prepatente médio de 3,9 dias, parasitemia relativamente elevada e letalidade de 40%. Os tripomastigotas sanguíneas, com cinetoplasto volumoso e subterminal, medem em média 25,00 micrômetros de comprimento total, 3,14 micrômetros de largura, e apresentam índice nuclear de 1,39; há predominância de "formas intermediárias". Ninhos de formas amastigotas foram encontrados no músculo cardíaco de animais sacrificados. A amostra estudada cultivava-se com facilidade em meios de Packchianiam e Warren, e infecta *T. infestans*, *T. sordida*, *R. neglectus* e *R. prolixus* com índices de 96,55%, 96,30%, 96,67% e 96,55%, respectivamente. Confere boa proteção contra posterior infecção por cepa altamente virulenta de *Trypanosoma cruzi*. O flagelado foi portanto identificado como *Trypanosoma cruzi*, havendo necessidade de maiores estudos para a avaliação do papel representado por aquela espécie silvestre de triatomíneo na Epidemiologia da Doença de Chagas na região.

INTRODUÇÃO

O *Triatoma tibiamaculata*, triatomíneo de hábitos silvestres cujos adultos ocasionalmente invadem moradias, não foi até o momento encontrado colonizando o peri domicílio ou o domicílio humano.

Sua distribuição geográfica, segundo CORRÊA¹ corresponde aos Estados de Sergipe, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo. FORATTINI (comunicação pessoal), que vem estudando triatomíneos no litoral sul de São Paulo, refere como biótopos desta espécie, ninhos de gambás localizados em palmeiras.

Dados fornecidos pela SUCEN revelam que entre 1953 e 1974, 34 exemplares adultos foram capturados em domicílios de diversos

Municípios do litoral do Estado; destes, 1 em Jacupiranga e 2 em Pariquera-Açu, quando examinados revelaram formas tripomastigotas em suas fezes. No Município de Ubatuba 7 exemplares já foram encontrados; o único que pôde ser examinado revelou-se negativo. Neste Município duas outras espécies foram detectadas: *Rhodnius domesticus*, espécie silvestre, e *Panstrongylus megistus*, que no litoral de São Paulo é também exclusivamente silvestre.

Em novembro de 1973 foi-nos trazida uma fêmea de *T. tibiamaculata* capturada no interior de moradia localizada na zona rural de Ubatuba, que, ao exame do material de

Trabalho do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

(1) Professor Assistente Doutor do Departamento de Parasitologia
(2) Ex-Auxiliar de Ensino do Departamento de Parasitologia
(3) Médico

sua ampola retal revelou formas tripomastigotas.

Com o intuito de melhor estudar o papel dos triatomíneos silvestres na transmissão da Doença de Chagas ao homem, devido à possível procura do domicílio humano por parte destas espécies em uma região em que ocorre desmatamento (COURA²), procuramos inicialmente estudar o flagelado encontrado, e verificar se realmente tratava-se de *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença, bem como as características da cepa.

MATERIAL E MÉTODOS

Os flagelados obtidos através da dissecação da ampola retal do triatomíneo foram inoculados intraperitonealmente em ratos e camundongos brancos jovens. Todos os animais se infectaram. Como a infecção nos camundongos mostrou-se inicialmente mais intensa, decidimos manter a amostra nestes animais.

A manutenção em camundongos albinos, com 20 dias de idade, foi feita mediante subinoculações com intervalos de 25 a 35 dias. Para isto usamos a via peritoneal, inoculando 0,2 ml de sangue obtido por punção cardíaca de doadores durante a fase patente da infecção. Em cada passagem usamos 5 camundongos; nos repiques I, III e V inoculamos lotes de 10 animais, nos quais estudamos o comportamento da infecção. Nestes repiques o inóculo foi de aproximadamente 12.600 tripomastigotas. Para obtermos este inóculo fizemos a contagem preconizada por BRENER³, ajustando a diluição do sangue com solução fisiológica.

O estudo morfológico e biométrico dos tripomastigotas sanguícolas foi feito em esfregaços de sangue corados pelo método de Giemsa, colhidos de diferentes animais, em várias fases da infecção. A micrometria foi realizada através de projeções em câmara clara e com uso de curvímeter. Alguns camundongos foram sacrificados durante a fase patente da infecção para que pudéssemos estudar as formas teciduais em impressão de órgãos corados pelo Giemsa e em cortes de tecidos corados pela hematoxilina eosina.

Para as provas de imunidade cruzada, 10 camundongos com infecção crônica foram

reinoculados, por via peritoneal, com 0,2 ml de sangue de camundongos com infecção aguda pela amostra Y; animais limpos, de mesma idade e peso, foram usados como testemunhos, recebendo o mesmo inóculo pela mesma via.

A infectividade para triatomíneos foi testada em 120 ninfas de 4.º e 5.º estágio de *Triatoma sordida*, *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Rhodnius neglectus*. Estas ninfas foram distribuídas em 15 lotes iguais, de modo que cada lote contivesse o mesmo número de exemplares de cada espécie, e alimentadas em camundongos na fase aguda da infecção. Uma vez bem alimentadas foram conservadas em temperatura ambiente e examinadas 30 dias após o repasto. O exame para a pesquisa de tripomastigotas foi realizado no conteúdo do intestino posterior dos triatomíneos, obtido por dissecação.

A cultivabilidade da amostra em estudo foi testada em meios de Packchianiam e de Warren, nos quais foram semeadas gotas de sangue de camundongos experimentalmente infectados e na fase aguda da infecção.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Morfologia dos tripomastigotas sanguícolas

Os tripomastigotas observados em esfregaços de sangue de camundongos experimentalmente infectados, corados pelo Giemsa, apresentam aspecto variável mas com os caracteres gerais do *Trypanosoma cruzi*, isto é, o tamanho médio, o cinetoplasto volumoso e arredondado ou ovóide e de localização subterminal, a membrana ondulante delicada e com pequeno número de ondulações, o núcleo ovóide ou reniforme e de localização subcentral (Fig. 1). Nestas preparações há predominância de formas em C, de largura e comprimento intermediários. A despeito de certo polimorfismo dos tripomastigotas, nunca encontramos formas tão largas como as observadas por FUNAYAMA & BARRETTO⁷ em amostra isolada de *Alouatta caraya* (Humboldt, 1812), nem tão longas e delgadas como as vistas por FUNAYAMA⁸, nas amostras isoladas de morcegos.

Na Fig. 2 apresentamos desenhos de tripomastigotas observados ao acaso, em pre-

parações de sangue colhido em diferentes dias do período patente da infecção. Os resultados da micrometria, efetuada com curvímeter sobre esses desenhos, são sumarizados no Quadro I.

As medidas apresentadas neste quadro, em particular o comprimento total médio e o índice nuclear médio, situam-se dentro dos limites de variação observados em amostras isoladas de casos humanos de Doença de Chagas, segundo FERRIOLLI⁶.

Morfologia das formas teciduais

O exame de cortes de tecidos de camundongos mortos durante a fase patente da infecção, revelou a presença de poucos ninhos de amastigotas na musculatura cardíaca (Fig. 3).

Infecção de animais de laboratório

A amostra, depois de isolada, foi mantida mediante subinoculações de sangue por via intraperitoneal em camundongos com 20 dias

de idade, com intervalos de 25 a 35 dias entre todos os animais adquiriram a infecção. Para estudo do comportamento da amostra destinamos 30 camundongos dentre os inoculados no 1.º, 3.º e 5.º repiques. Os caracteres gerais da infecção são sumarizados no Quadro II.

O exame deste quadro indica que o período prepatente variou entre 2 e 11 dias com média de 3,9 dias. A parasitemia, embora variável, mostrou-se relativamente elevada, superando o nível de 1.000 flagelados por mm³ de sangue em 56,6% dos animais apesar do inóculo conter um número pequeno de tripomastigotas (12.600). A parasitemia máxima foi observada entre o 18.º e 50.º dia (CV-6 e CV-5) e a variação apresentada foi de 56 tripomastigotas por mm³ a 4.130 (CV-7 e CV-8). A duração da fase patente nos animais que sobreviveram variou de 29 a 72 dias (CV-10 e CIII-3); aliás dos 30 animais estudados 18 sobreviveram o que representa uma taxa de letalidade de 40%.

Os tipos de curvas parasitêmicas variaram muito, mesmo em animais de um mesmo lote. Na Fig. 4 apresentamos alguns tipos de curvas. Verificamos que em todos os camundongos a infecção determinou níveis parasitêmicos baixos durante as 2 ou 3 semanas iniciais, para depois se elevar, e geralmente de maneira irregular, com formação de 2 ou mais picos. Nesta figura estão representadas curvas parasitêmicas de 3 animais que morreram; verificamos que a morte se deu ora na vigência do ápice da parasitemia, ora no declínio da mesma.

Infectividade para triatomíneos

Os resultados obtidos nesta experiência estão sumarizados no Quadro III e mostram que as 4 espécies empregadas são muito susceptíveis a esta amostra de *Trypanosoma*

Cultivabilidade

Mediante a sementeira de algumas gotas de sangue colhidas de camundongos com infecção patente obtivemos bom crescimento inicial em 3 tubos de meio de cultura Pachaniam e em 3 tubos de meio de Warre

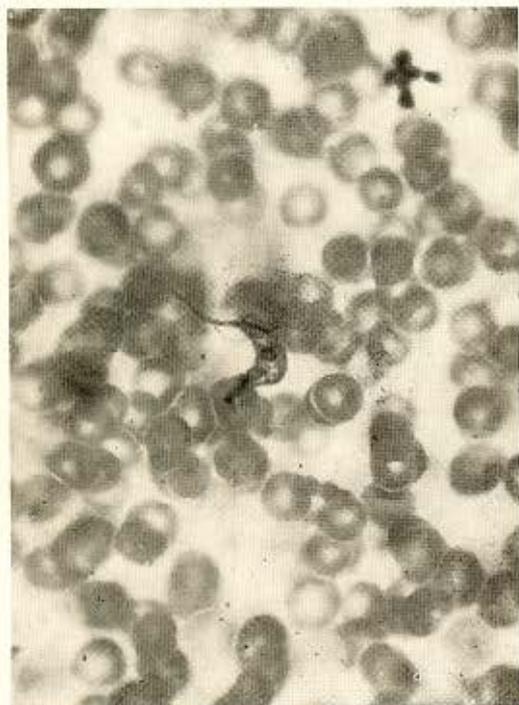


Fig. 1 — Microfoto de tripomastigota sangüícola de camundongo infectado com a amostra isolada do *T. fibiamaculata* (900 X)

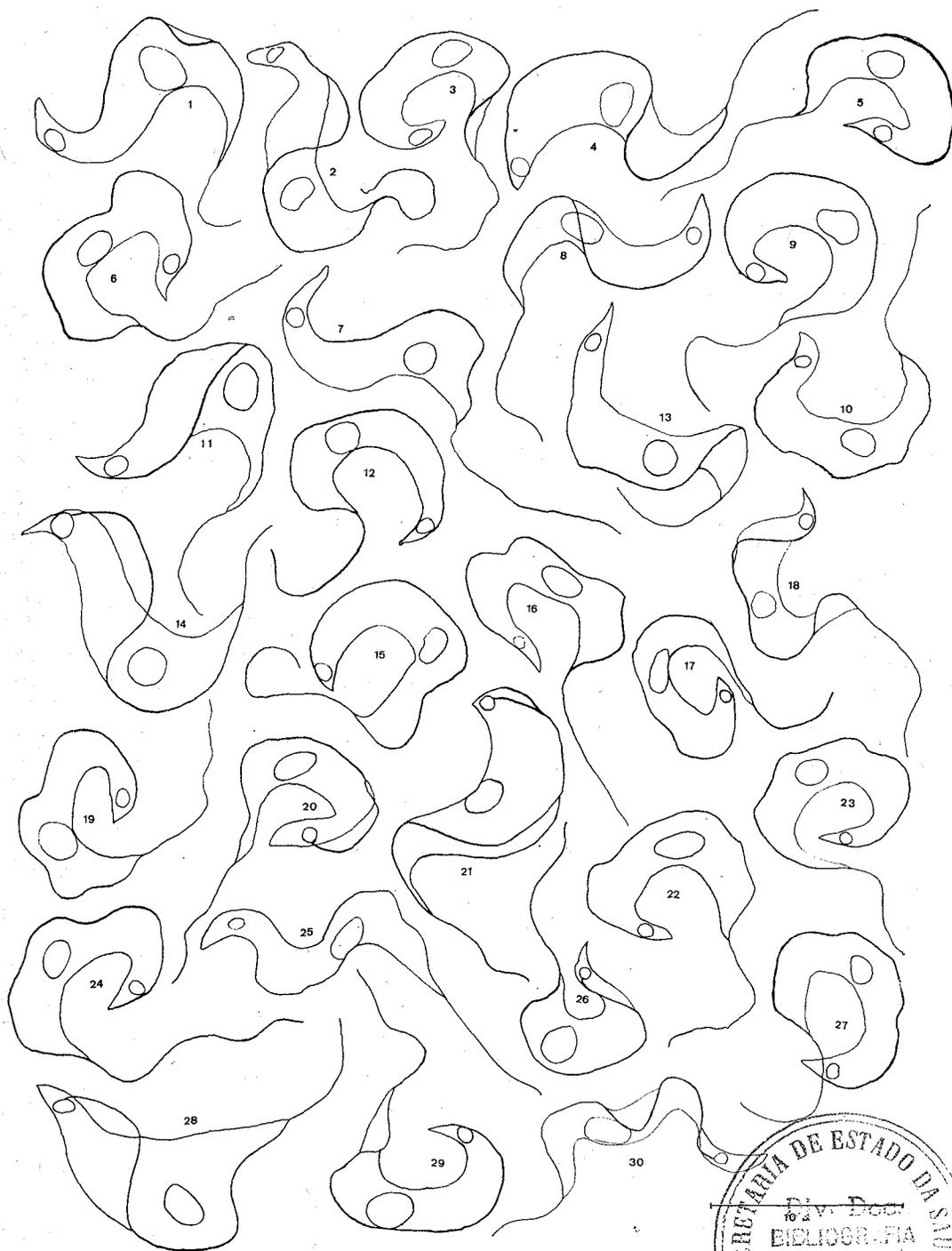


Fig. 2 — Desenhos de tripomastigotas sangüícolas de camundongos infectados com a amostra isolada de *T. tibiamaculata*



Depois de isolada, a amostra tem sido mantida facilmente em cultura, fazendo-se repiques quinzenais.

Provas de proteção

Em apenas quatro animais reinoculados com a cepa Y na fase crônica, conseguiu-se



Fig. 3 — Microfoto de ninho de amastigotas observado no coração de camundongo infectado com a amostra isolada de *T. tibiamaculata* (900 x)

detectar uma pequena parasitemia que durou poucos dias. Nos outros seis não se conseguiu visualizar tripomastigotas ao exame microscópico; nenhum dos animais veio a falecer. Todos animais testemunhos, partir do 4.º dia da inoculação, exibiram parasitemia crescente, vindo a morrer entre o 12.º e o 16.º dia. Portanto a prévia inoculação com a cepa em estudo conferiu proteção à inoculação posterior de cepa altamente virulenta.

CONCLUSÃO

Os caracteres morfológicos do *Trypanosoma* isolado de *Triatoma tibiamaculata* capturado em Ubatuba, associados à sua infectividade para triatomíneos, fácil cultivo em meios de cultura, patogenicidade para camundongos, aos quais confere proteção contra posterior inoculação pela cepa Y, permitem, segundo BARRETTO^{4,5}, identificá-lo como *Trypanosoma cruzi*.

SUMMARY

First finding of Triatoma tibiamaculata Pinto, 1926 naturally infected by *Trypanosoma cruzi* in Ubatuba, São Paulo, Brazil.

The Authors report the finding of the first specimen of *Triatoma tibiamaculata* in Ubatuba, São Paulo; the examination of the rectal material showed the presence of trypanomastigotes. The study of the strain by in-

QUADRO I

Resultados da micrometria realizada sobre tripomastigotas do sangue periférico de camundongos experimentalmente infectados com a amostra isolada do *T. tibiamaculata*

Especificação	Medidas em micrômetros			
	Mínima	Máxima	Média	Desvio padrão
Comprimento do flagelo	4,0	12,0	7,85	± 1,45
Distância N A	4,9	9,0	7,32	± 1,07
Distância N P	8,0	11,5	9,87	± 0,95
Comprimento do corpo	14,5	18,6	17,16	± 1,01
Comprimento total	21,5	29,5	25,00	± 1,91
Largura do corpo	2,0	5,9	3,14	± 0,89
Diâmetro do cinetoplasto	0,6	1,2	0,89	± 0,17
Relação NP/NA	0,84	2,24	1,39	± 0,33

TAKEDA, G. K. F.; MOREIRA, F. E.; REAES, T. de B. & CASTANHO, M. L. S. — Primeiro encontro de *Triatoma tibiamaculata* Pinto, 1926 naturalmente infectado por *Trypanosoma cruzi* no Município de Ubatuba, São Paulo. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 18:402-409, 1976.

QUADRO II

Caracteres gerais da infecção de camundongos pela amostra isolada do *T. tibiamaculata*

Lote e animal	Período prepatente (dias)	Parasitemia máxima		Período patente (dias)	Observações
		n.º/mm²	dia		
CI-1	4	3.822	46.º	—	Óbito no 73.º dia
CI-2	4	2.331	29.º	66	Sobreviveu
CI-3	4	896	36.º	61	Sobreviveu
CI-4	4	3.052	32.º	—	Óbito no 35.º dia
CI-5	4	1.624	25.º	54	Sobreviveu
CI-6	4	4.130	36.º	68	Sobreviveu
CI-7	4	2.093	25.º	—	Óbito no 47.º dia
CI-8	4	959	34.º	64	Sobreviveu
CI-9	4	413	36.º	47	Sobreviveu
CI-10	4	1.946	25.º	43	Sobreviveu
CH-1	2	1.379	34.º	35	Sobreviveu
CH-2	2	1.526	38.º	40	Sobreviveu
CH-3	2	672	45.º	72	Sobreviveu
CH-4	2	1.456	27.º	—	Óbito no 33.º dia
CH-5	2	2.184	29.º	—	Óbito no 34.º dia
CH-6	2	1.834	27.º	—	Óbito no 44.º dia
CH-7	2	532	27.º	—	Óbito no 35.º dia
CH-8	2	1.176	27.º	—	Óbito no 28.º dia
CH-9	2	2.436	36.º	—	Óbito no 40.º dia
CH-10	2	1.148	27.º	—	Óbito no 30.º dia
CV-1	4	3.311	34.º	—	Óbito no 36.º dia
CV-2	4	2.422	34.º	39	Sobreviveu
CV-3	4	259	41.º	51	Sobreviveu
CV-4	4	770	29.º	45	Sobreviveu
CV-5	11	592	50.º	53	Sobreviveu
CV-6	9	238	18.º	—	Óbito no 20.º dia
CV-7	9	56	29.º e 39.º	40	Sobreviveu
CV-8	4	56	32.º	43	Sobreviveu
CV-9	4	98	34.º e 41.º	45	Sobreviveu
CV-10	4	210	29.º	29	Sobreviveu

QUADRO III

Susceptibilidade de 4 espécies de triatomíneos à amostra isolada do *T. tibiamaculata*

Espécie	Exemplares alimentados	Exemplares examinados	Exemplares positivos
<i>Triatoma infestans</i>	30	29	28 — 96,55%
<i>Triatoma sordida</i>	30	27	26 — 96,30%
<i>Rhodnius prolixus</i>	30	29	28 — 96,55%
<i>Rhodnius neglectus</i>	30	30	29 — 96,67%

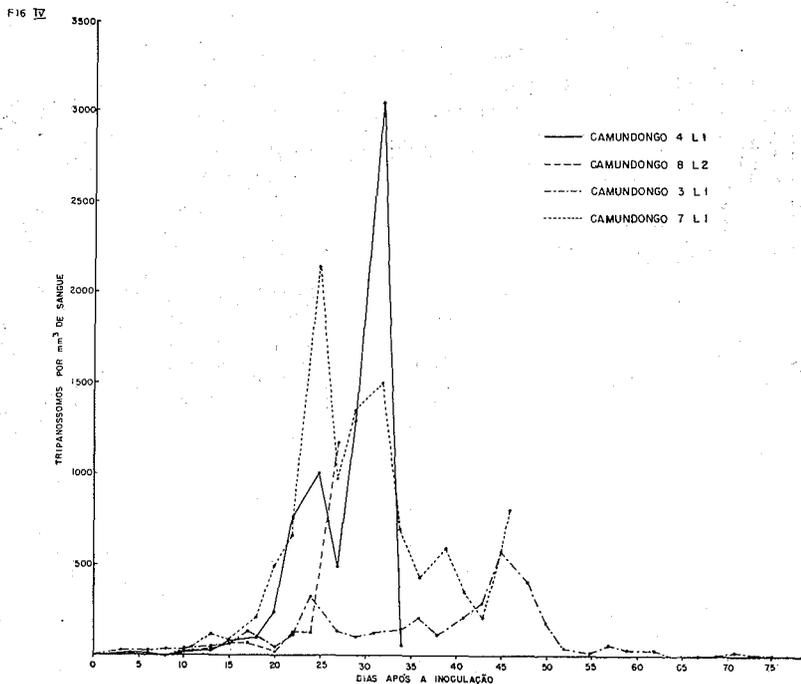


Fig. 4 — Tipos de curvas parasitêmicas observadas em camundongos inoculados com a amostra isolada de *T. tibiamaculata*

cultation in young white mice showed 100% of infection, a middle value prepatent period of 3,9 days, relatively high parasitaemia and mortality of 40 per cent. The blood trypomastigotes, with a bulky, subterminal kinetoplast, measured 25,00 micrometres total average length, 3,14 micrometres average width, with an average nuclear index of 1,39; there is predominance of "intermediate forms". Amastigotes were found in the cardiac muscles of sacrificed animals. The studied strain is easily cultivated in Packchianiam and Warren media, and infects *T. infestans*, *T. sordida*, *R. neglectus* e *R. prolixus* with percentages of 96.55%, 96.30%, 96.37% and 96.55%, respectively. It gives good protection against posterior infection by a highly virulent strain of *T. cruzi*. Hence, the flagellate was identified as *Trypanosoma cruzi*, being necessary further studies for the appraising of the epidemiological importance of that species concerning Chagas' Disease in Ubatuba.

AGRADECIMENTO

Agradecemos à SUCEN — Superintendência de Controle de Endemias pelos dados gentilmente fornecidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CORRÊA, R. R. — Informe sôbre a doença de Chagas no Brasil e em especial no Estado de São Paulo. *Rev. Brasil. Malar. Doenças Trop.* 20:30-34, 1968.
2. COURA, J. R.; FERREIRA, L. F. & SILVA, J. R. — Triatomíneos no Estado da Guanabara e suas relações com o domicílio humano. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 8:162-166, 1966.
3. BRENER, Z. — Observações sobre a imunidade e super infecções em camundongos experimentalmente inoculados com *Trypanosoma cruzi* e submetidos a tratamento. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 4:119-123, 1961.
4. BARRETTO, M. P. — Reservatórios do *Trypanosoma cruzi* nas Américas. *Rev. Brasil. Malar. Doenças Trop.* 4:527-552, 1964.

TAKEDA, G. K. F.; MOREIRA, F. E.; REAES, T. de B. & CASTANHO, M. L. S. — Primeiro encontro de *Triatoma tibiamaculata* Pinto, 1926 naturalmente infectado por *Trypanosoma cruzi* no Município de Ubatuba, São Paulo. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 18:402-409, 1976.

5. BARRETTO, M. P. — Tripanossomos semelhantes ao *Trypanosoma cruzi* em animais silvestres e sua identificação com o agente etiológico da Doença de Chagas. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 7:305-315, 1965.
6. FERRIOLLI, F. F.; BARRETTO, M. P. & CARVALHEIRO, J. R. — Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXIV — Variação dos dados biométricos obtidos em amostras de *T. cruzi* isolados de casos humanos da Doença de Chagas. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.* 2:1-8, 1968.
7. FUNAYAMA, G. K. & BARRETTO, M. P. — Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XVI — Infecção natural do simio *Alouatta caraya* (Humboldt, 1812) pelo *T. cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 12:257-265, 1970.
8. FUNAYAMA, G. K. — Novos hospedeiros do *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Brasil. Biol.* 33: 581-588, 1973.

Recebido para publicação em 19/11/1975.