

## ESTUDOS SÔBRE RESERVATÓRIOS E VECTORES SILVESTRES DO *TRYPANOSOMA CRUZI*

### XVI — Infecção natural do ouriço, *Coendou insidiosus insidiosus* (Kuhl, 1820) por tripanossomo semelhante ao *T. cruzi*

A. F. SIQUEIRA, F. FERRIOLLI Filho e M. P. BARRETTO

#### RESUMO

Tripanossomo semelhante ao *T. cruzi* foi isolado, por xenodiagnóstico, de um ouriço, *Coendou insidiosus insidiosus* (Kuhl, 1820) capturado no Município de Descalvado, São Paulo. Este tripanossomo mostrou-se patogênico para o camundongo jovem, infetando todos os animais inoculados. As formas sanguícolas medem, em média,  $21,13 \pm 2,19 \mu$  e têm índice nuclear médio de  $1,56 \pm 0,25$ . Nos animais inoculados experimentalmente observam-se numerosos ninhos de leishmânias, principalmente no coração, durante a fase aguda. A infecção do camundongo caracteriza-se por período prepatente médio de 6,16 dias; parasitemia muito variável, mas, por vezes, elevada, atingindo 70.000 flagelados por  $\text{mm}^3$  de sangue; longa duração da fase aguda que variou de 41 a 90 dias; taxa de letalidade de 13,33%. Este tripanossomo confere aos animais que sobrevivem alto grau de resistência contra reinoculações da amostra Y do *T. cruzi*, que é altamente virulenta para o camundongo. Cultiva-se bem em meio de ágar-sangue e infeta regularmente triatomíneos, dando os seguintes índices: *T. infestans* — 90,0%, *T. sordida* — 90,0%, *P. megistus* — 90,0% e *R. neglectus* — 86,6%.

#### INTRODUÇÃO

A infecção natural de um roedor da família *Erethizontidae* foi, pela primeira vez, assinalada na Venezuela, onde PIFANO<sup>7</sup> observou um ouriço, *Coendou prehensilis prehensilis* (Linnaeus, 1758) infetado por tripanossomo semelhante ao *T. cruzi* e considerou este mamífero como possível reservatório. ARMAS<sup>1</sup> refere-se à infecção do *Coendou vestitus pruinosus* Thomas, 1905 na Venezuela. Mas DIAS<sup>3</sup>, embora expressando dúvida, acha que esta referência diz respeito ao *C. prehensilis*. Parece assistir razão ao Autor brasileiro uma vez que PIFANO<sup>8</sup>, relacionando os reservatórios da Venezuela, men-

ciona apenas o *C. prehensilis*. Por outro lado, na Costa Rica, ZELEDÓN & col.<sup>9</sup> assinalam a infecção natural de um exemplar de *Coendou mexicanum laenatum*, mostrando que o tripanossomo, além de ter características morfológicas do *T. cruzi*, infeta o *R. prolixus*, é patogênico para camundongos, multiplica-se sob a forma de leishmânias e cultiva-se em meio de ágar-sangue.

No decurso de nossas investigações sobre reservatórios silvestres do *T. cruzi*, tivemos a oportunidade de examinar dois exemplares do ouriço, *Coendou insidiosus insidiosus* (Kuhl, 1820). Um dos exemplares, proce-

Trabalho do Departamento de Parasitologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, realizado em parte com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e do Conselho Nacional de Pesquisas

dente de Ribeirão Preto, mostrou-se negativo, mas o outro, capturado, pelo Prof. F. Köberle, na Fazenda Monte Alegre em Descalvado, São Paulo, apresentou infecção natural por um tripanossomo cujo estudo constituiu objeto do presente trabalho.

Este animal, conhecido por ouriço caixeiro e também imprópriamente, por porco-espinho, como os demais representantes do gênero, possui espinhos fortes e aguçados que aparecem entre os pêlos longos e finos que revestem o corpo e a maior parte da cauda, pés munidos de quatro dedos dotados de unhas longas e recurvadas, cauda prenil recurvada para cima e cabeça larga.

O corpo, incluindo a cabeça, mede cerca de 35 cm e a cauda cerca de 26 cm. O colorido geral é pardo-acinzentado, mais claro na face ventral. Na cabeça, pescoço, ao longo do dorso e na metade basal da cauda os espinhos são pretos na base e pardos na extremidade distal, no restante da face dor-

sal os espinhos são amarelos com a extremidade distal parda. O mento, garganta e ventre, completamente destituídos de espinhos, são revestidos de pêlos curtos, sedosos e amarelados; na região anal e na face inferior da metade basal da cauda os pêlos se tornam rígidos e são ferrugíneos.

O ouriço é um roedor arborícola, construindo seu ninho em ramos de árvores. É frugívoro e se alimenta de frutos silvestres; mas come também frutas cultivadas, frequentando mesmo pomares situados perto de habitações humanas.

#### MATERIAL E MÉTODOS

A partir de triatomíneos usados no xenodiagnóstico e que se mostraram positivos, a amostra que recebeu a denominação Ou-1161, foi isolada em camundongos brancos jovens. Subseqüentemente ela foi man-

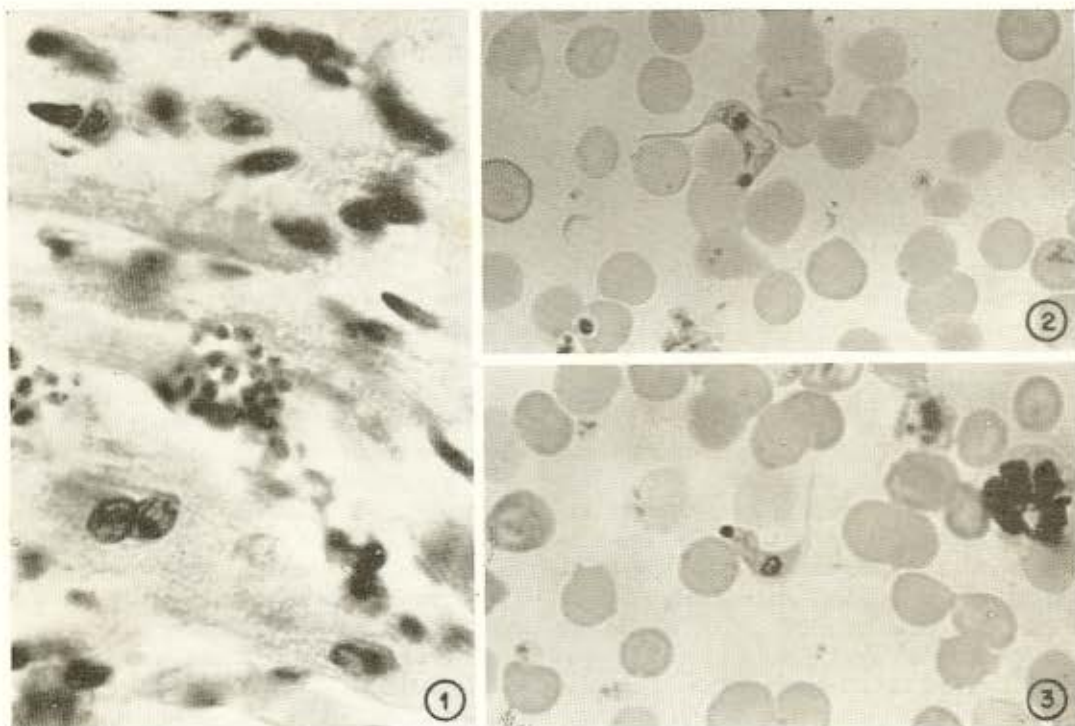


Fig. 1 — Formas em leishmânia em corte de coração de camundongo experimentalmente infectado (Hematoxilina-Eosina, 2.400 ×)

Figs. 2 e 3 — Formas em tripanossomo do sangue de camundongo experimentalmente infectado (Giemsa, 2.400 ×)

tida regularmente, mediante subinoculações de sangue, por via peritoneal, em camundongos brancos com 18-20 dias de idade, fazendo-se as repicagens com intervalos de 15 a 20 dias.

Para o estudo morfológico dos flagelados sanguícolas e tissulares, assim como para a observação do comportamento da infecção, lançamos mão de 30 animais, isto é, lotes de cinco camundongos do primeiro, terceiro e quinto repiques, um lote de sete do sétimo repique e um lote de oito no décimo-segundo repique. Para a verificação da suscetibilidade de triatomíneos, lotes homogêneos contendo números iguais de exemplares de *T. infestans*, *T. sordida*, *P. megistus* e *R. neglectus* foram alimentados em camundongos na fase aguda da infecção. As provas de imunidade cruzada foram realizadas com um lote de 10 camundongos jovens.

Deixamos de entrar em maiores detalhes a respeito das técnicas usadas, visto que elas foram detalhadamente descritas em trabalhos anteriores <sup>4, 5</sup>.

#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

*Morfologia das formas sanguícolas* — Em esfregaços de sangue colhido da cauda de camundongos infetados com o tripanossomo isolado do ouriço, encontramos flagelados com as características morfológicas comuns à maioria das amostras de *T. cruzi* já estu-

dadas. Na simples observação dos esfregaços tivemos a atenção voltada para dois fatos: núcleo situado no terço médio do corpo, geralmente mais próximo da extremidade anterior que da posterior, e grande predomínio de formas largas em relação às finas.

Na Prancha 1 estão desenhados 36 tripanossomos escolhidos ao acaso e que são os mesmos usados para a efetivação da micrometria. Nela pode ser observado o fato anteriormente assinalado, isto é, a raridade das formas longas e finas (Figs. 14 e 17) e o predomínio das formas largas ou médias com muito poucas, curtas (Figs. 7 e 36).

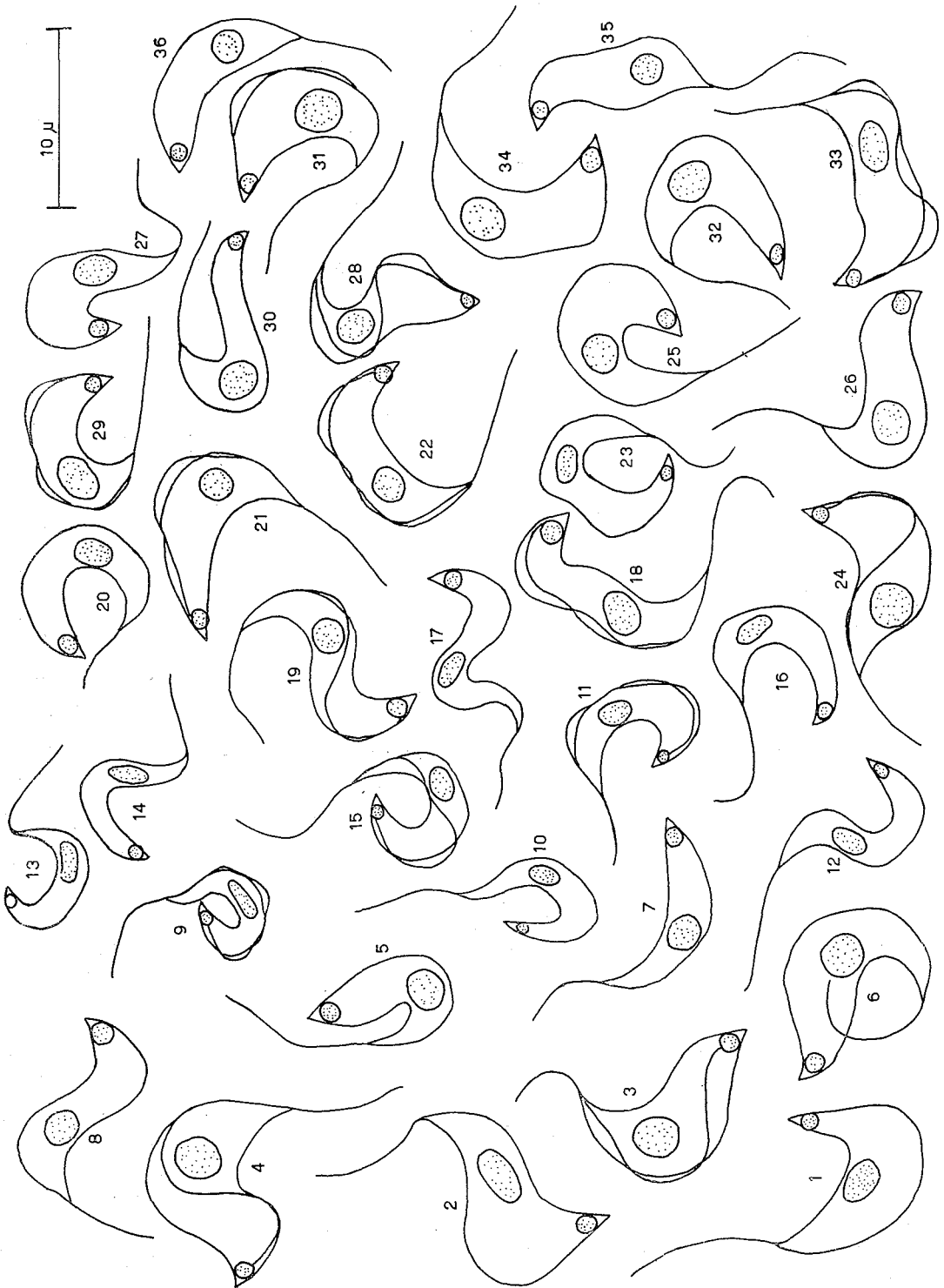
Os resultados obtidos com a micrometria feitas sobre estes 36 tripanossomos estão expressos no Quadro I.

Estes dados confirmam a impressão geral que tivemos sobre a morfologia desta amostra de tripanossomo, salientando-se a largura do corpo, cuja média ( $3,22 \pm 1,01$ ) supera à da maioria dos tripanossomos de animais que temos estudado. Da mesma forma o índice nuclear médio ( $1,56 \pm 0,25$ ) supera quase todos os encontrados para amostras de *T. cruzi* isoladas de animais, com exceção apenas daquela da *Marmosa agilis agilis*, estudada por CORRÊA & BARRETTO <sup>2</sup>. De qualquer modo os dados apresentados no Quadro I caem perfeitamente dentro das variações amplas encontradas pelos diversos Autores que estudaram amostras

#### QUADRO I

Resultado de mensurações feitas sobre 36 tripanossomos do sangue periférico de camundongos infetados experimentalmente com a amostra isolada do *Coendou insidiosus insidiosus*

Caracteres	Medidas em micra		
	Mínima	Máxima	Média
Comprimento do flagelo .....	4,11	8,90	$6,75 \pm 1,37$
Distância NP .....	6,16	10,41	$8,69 \pm 0,90$
Distância NA .....	4,11	8,22	$5,69 \pm 0,93$
Comprimento do corpo .....	10,96	17,26	$14,38 \pm 1,46$
Comprimento total .....	16,58	25,34	$21,13 \pm 2,19$
Largura do corpo .....	1,51	5,21	$3,22 \pm 0,01$
Diâmetro do cinetoplasto .....	1,10	1,51	$1,26 \pm 0,12$
Relação NP/NA .....	1,00	2,00	$1,56 \pm 0,25$



Prancha 1 — Ver descrição no texto

de *T. cruzi* isoladas tanto de casos humanos como de animais.

*Morfologia das formas tissulares* — Em cortes de órgãos de camundongos inoculados com o tripanossomo isolado do ouriço encontramos ninhos de leishmânias, sobretudo em fibras cardíacas. Em esfregaços feitos com fragmento de coração de camundongos em fase aguda da infecção verificamos a presença de leishmânias arredondadas ou ovóides, com o maior diâmetro variando entre 4 e 7  $\mu$  e o menor entre 3 e 5  $\mu$ . O núcleo arredondado se contrapõe ao cinetoplasto bastonetiforme ou encurvado. Não encontramos formas em leptomônade, nem em critídia.

*Infecção de animais de laboratório* — Como dissemos, a partir de seu isolamento a

amostra em estudo foi mantida em camundongos mediante inoculação intraperitoneal de 0,1 ml de sangue colhido por punção cardíaca em doadores na fase ascensional da infecção, isto é, entre o 15.º e 20.º dia após a inoculação. Nos repiques de números 1, 3, 5, 7 e 12 usamos maior número de camundongos e separamos lotes de 5, 5, 5, 7 e 8 animais, respectivamente, para nêles estudarmos a parasitemia e os demais caracteres da infecção. Releva notar que todos os camundongos inoculados adquiriram a infecção. Os dados obtidos são apresentados no Quadro II.

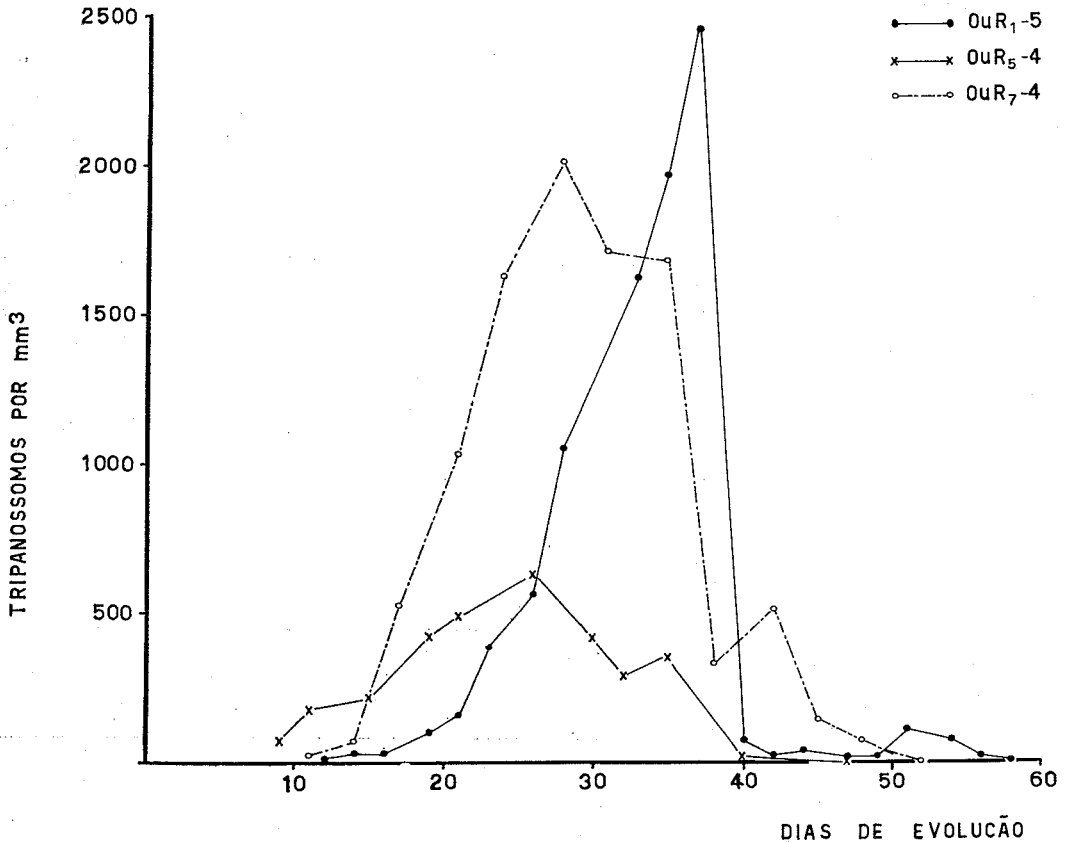
O exame dêste quadro mostra que o período prepatente variou entre cinco e sete dias, com média de 6,16 dias. Ainda que o número de animais de cada lote haja sido

#### QUADRO II

Caracteres gerais da infecção de camundongos inoculados com o tripanossomo isolado do *Coendou insidiosus insidiosus*

N.º do animal	Período prepatente (dias)	Parasitemia máxima		Fase aguda em dias	Observações
		N.º mm <sup>3</sup>	Dia		
OuR1-1	7	3.654	37.º	67	Sobreviveu
OuR1-2	7	11.200	33.º	54	Sobreviveu
OuR1-3	7	2.100	37.º	—	Contagem suspensa no 85.º dia
OuR1-4	7	1.155	37.º	51	Sobreviveu
OuR1-5	7	2.450	37.º	58	Sobreviveu
OuR3-1	6	35.000	37.º	—	Morreu no 38.º dia
OuR3-2	7	11.900	37.º	—	Contagem suspensa no 90.º dia
OuR3-3	6	21.000	37.º	—	Contagem suspensa no 90.º dia
OuR3-4	6	70.000	35.º	—	Morreu no 36.º dia
OuR3-5	7	11.760	33.º	—	Contagem suspensa no 90.º dia
OuR5-1	7	280	26.º	58	Sobreviveu
OuR5-2	6	5.880	32.º	—	Morreu no 35.º dia
OuR5-3	6	2.660	32.º	54	Sobreviveu
OuR5-4	6	630	27.º	47	Sobreviveu
OuR5-5	7	3.150	27.º	57	Sobreviveu
OuR7-1	5	644	21.º	52	Sobreviveu
OuR7-2	5	980	21.º	52	Sobreviveu
OuR7-3	5	1.652	21.º	45	Sobreviveu
OuR7-4	7	2.009	28.º	52	Sobreviveu
OuR7-5	7	3.486	31.º	52	Sobreviveu
OuR7-6	6	5.348	42.º	54	Sobreviveu
OuR7-7	5	3.395	24.º	52	Sobreviveu
OuR12-1	6	560	34.º	55	Sobreviveu
OuR12-2	6	5.600	37.º	49	Sobreviveu
OuR12-3	6	5.852	37.º	—	Morreu no 42.º dia
OuR12-4	6	1.288	34.º	55	Sobreviveu
OuR12-5	6	980	23.º	41	Sobreviveu
OuR12-6	5	686	23.º	55	Sobreviveu
OuR12-7	6	287	41.º	55	Sobreviveu
OuR12-8	5	420	23.º	41	Sobreviveu

Gráfico I



pequeno, não permitindo assim conclusão muito segura, verifica-se que não houve tendência de variação do período prepatente nos repiques sucessivos.

A parasitemia mostrou-se relativamente elevada nos camundongos usados no primeiro repique, embora variasse muito de um animal a outro, dentro de um mesmo lote; em um deles (OuR1-4) a parasitemia máxima observada no 37.º dia após a inoculação, foi de 1.155 flagelados por mm<sup>3</sup>, enquanto em outro (OuR1-2) ela atingiu 11.200 flagelados por mm<sup>3</sup> de sangue. A parasitemia acentuou-se nos camundongos do terceiro repique, variando os níveis máximos entre 11.760 e 70.000 flagelados por mm<sup>3</sup> de sangue. A partir do quinto repique a parasitemia tornou-se mais moderada, os níveis máximos só ultrapassando a casa dos 5.000

em quatro animais (OuR5-2, OuR7-7, OuR12-2 e OuR12-3). A parasitemia máxima ocorreu entre o 21.º e o 37.º dia. Observa-se, em relação à amostra em estudos, um fato até certo ponto semelhante ao assinalado por PHILLIPS<sup>6</sup>, que verificou, em animais subinoculados com uma amostra de procedência humana, um decréscimo da parasitemia nos repiques sucessivos. Mas não observamos a regularidade do declínio apontado pelo Autor acima referido. Como se pode ver no Quadro II, a parasitemia em animais do mesmo lote oscilou muito; assim no 12.º repique os níveis parasitêmicos máximos oscilaram entre 287 (OuR12-7) e 5.852 (OuR12-3).

A duração da fase aguda variou entre 41 e 90 dias. Apenas quatro camundongos morreram, tendo a morte ocorrido em plena fase aguda. Coincidentemente, todos os ani-

mais que morreram apresentaram parasitemias altas, embora camundongos também com parasitemias altas hajam sobrevivido.

As curvas parasitêmicas observadas entre os camundongos dos dois primeiros lotes mostraram ascensão progressiva até atingir o máximo por volta do 32.º ao 37.º dia quando sofriam queda abrupta, mantendo-se por mais algum tempo em níveis relativamente baixos (Gráfico I, OuR1-5). A partir do quinto repique, quando se observou uma diminuição sensível nas parasitemias máximas, as curvas passaram a ter aspecto um pouco diferente: elevação progressiva e queda paulatina (Gráfico I, OuR7-4 e OuR5-4). De qualquer modo, após período variável (41 a 90 dias), o número de tripanossomos presentes no sangue circulante cai a níveis submicroscópicos e raramente são encontrados ao exame a fresco.

*Imunidade cruzada* — De um lote de 10 camundongos jovens, com o mesmo pêso e idade, cinco foram inoculados com a amostra em estudo e cinco foram deixados como contrôles. Uma vez superada a fase aguda pelos animais infetados, aos 60 dias, todos foram inoculados com 0,2 ml de sangue de animais altamente parasitados pela amostra Y.

Os camundongos que haviam passado para a fase crônica da infecção e que foram reinoculados com a amostra Y, aparentemente não contrairam a infecção, pois exames minuciosos feitos seguidamente nos mesmos revelaram o encontro casual de uns poucos tripanossomos, enquanto que os camundongos contrôles, inoculados com quantidade idêntica de tripanossomos, demonstraram parasitemias elevadas e vieram a morrer no decurso da infecção. Isto mostra que o tripanossomo isolado do ouriço confere alto grau de resistência contra a reinfecção por amostra humana extremamente virulenta.

*Infecção de triatomíneos* — Ninfas em quinto estágio de *T. infestans*, *T. sordida*, *P. megistus* e *R. neglectus* foram separadas em lotes, cada um contendo número igual de exemplares de cada espécie; estas ninfas foram alimentadas em camundongos com infecção na fase aguda e, depois, mantidas à temperatura ambiente. Examinadas 30 dias

depois deram os resultados apresentados no Quadro III.

#### QUADRO III

Suscetibilidade de quatro espécies de triatomíneos à amostra de tripanossomo isolado do *Coendou insidiosus insidiosus*

Espécie	Exemplares alimentados	Exemplares positivos	
		N.º	%
<i>T. infestans</i> ...	30	27	90,0
<i>T. sordida</i> .....	30	27	90,0
<i>R. neglectus</i> ...	30	26	86,6
<i>P. megistus</i> ...	30	27	90,0

Êstes resultados indicam que as quatro espécies usadas são altamente suscetíveis ao tripanossomo do ouriço, não havendo diferenças significativas entre os índices de infecção das várias espécies.

*Cultivo* — Semeando sangue de camundongo infetado com o tripanossomo isolado do ouriço em meio de Mac Neal-Novy obtivemos bom crescimento inicial. Nos repiques sucessivos, feitos com intervalos de 15 a 20 dias, as culturas exibiram crescimento abundante.

#### DISCUSSÃO

Os caracteres morfológicos e biológicos do tripanossomo estudado, aliados ao comportamento da infecção em camundongos e aos resultados das provas de imunidade cruzada, levam-nos a identificá-lo com *T. cruzi* e a considerar o ouriço, *Coendou insidiosus insidiosus* (Kuhl, 1820) como hospedeiro natural do parasita.

O encontro de um único exemplar com infecção natural não nos permite tecer maiores comentários sôbre o papel desempenhado pelo ouriço na epidemiologia da tripanossomose americana.

Relativamente aos vectores, parece que o *P. megistus* seja responsável pela transmissão. Com efeito, no dia imediato ao da

captura do ouriço realizamos pesquisas de triatomíneos no local e em ocós e anfractuosi- dades de uma árvore situada na sebe onde o ouriço foi apanhado, conseguimos coletar 19 exemplares, seis adultos e 13 ninfas da- quele triatomíneo. Quatro exemplares, dois adultos e duas ninfas estavam infetados; reações de precipitina praticadas com o con- teúdo do tubo digestivo dos triatomíneos de- rram resultados para sangue de roedor em quatro casos, sangue de ave em dois casos e sangue de roedor e ave em um caso; um dos exemplares com sangue de roedor e o tria- tomíneo com sangue de roedor e ave se achavam entre os infetados.

Estamos aqui diante de uma evidência in- direta, mas o fato de não encontrarmos si- nais de outros roedores nas proximidades reforça o nosso ponto de vista.

#### SUMMARY

*Studies on wild reservoirs and vectors of Trypanosoma cruzi. XVI — Natural infection of a porcupine, Coendou insidiosus insidiosus (Kuhl, 1820) by cruzi-like trypanosome.*

A *cruzi*-like trypanosome was isolated through xenodiagnosis from a porcupine captured at Descalvado, State of São Paulo, Brasil. This flagellate is pathogenic for baby mice, giving an infection-rate of one hundred per cent. Blood trypanosomes have a mean total length of  $21.13 \pm 2.19 \mu$  and a mean nuclear index of  $1.56 \pm 0.25$ . Leishmanial forms are easily seen in tissue section, specially in heart sections of experimentally infected animals. The infection is characterized by a 6.16 days prepatent period, variable but sometimes very high parasitemia, long duration of the acute phase and mortality index of 13.3 per cent. This trypanosome gives complete resistance to mice against re-inoculation with the Y-strain of *T. cruzi*. It is easily cultivated in blood-agar media and infects regularly various species of triatomines, giving the following infection indices: *T. infestans* —

90.0 per cent, *T. sordida* — 90.0 per cent, *P. megistus* — 90.0 per cent and *R. neglectus* — 86.6 per cent.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARMAS, J. — *Enfermedad de Chagas*. Em: *El problema de la insalubridad rural en el Estado Guárico*. Buenos Aires, El Ateneu, 1944, p.p. 98-121.
2. CORRÊA, F. M. A. & BARRETTO, M. P. — Estudos sobre reservatórios e vectores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. III — Infecção natural do marsupial *Marmosa agilis agilis* por tripanossomo semelhante ao *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 6:157-166, 1964.
3. DIAS, E. — Doença de Chagas nas Américas. IV — Colômbia, Venezuela e Guianas. *Rev. Brasil. Malariol. Doenças Trop.* 4:255-280, 1952.
4. FERRIOLLI Filho, F. & BARRETTO, M. P. — Estudos sobre reservatórios e vectores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. VI — Infecção natural do roedor *Akodon arviculoides cursor* (Winge, 1885) por tripanossomo semelhante ao *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 7:72-81, 1965.
5. FERRIOLLI Filho, F. & BARRETTO, M. P. — Estudos sobre reservatórios e vectores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. IX — Infecção natural do *Rattus rattus* (Lin., 1758) por tripanossomo semelhante ao *T. cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 7:169-179, 1965.
6. PHILLIPS, N. R. — Experimental studies on the quantitative transmission of *Trypanosoma cruzi*. Considerations regarding the standardization of material. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 54:60-70, 1960.
7. PIFANO, F. — Sobre um tripanosoma de *Coendou prehensilis* L. (puerco espín). Possible reservorio de *Schizotrypanum cruzi* in la naturaleza. *Gac. Med. Caracas* 48:77-78, 1940.
8. PIFANO, F. — Algunos aspectos de la enfermedad de Chagas en Venezuela. *Arch. Venez. Med. Trop. Parasit. Med.* 3:73-99, 1960.
9. ZELEDÓN, R.; PÉREZ, C. L. & BERRÍOS, A. — Hallazgo de *Schizotrypanum cruzi* en un puerco espín (*Coendou mexicanum laenatum*) de Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 8:201-202, 1960.

Recebido para publicação em 16/11/1966.