

Técnica do xenodiagnostico na molestia de Chagas *

pelo

Dr. Emmanuel Dias

(Instituto Oswaldo Cruz)

(Com 2 estampas)

A enorme importancia que tem adquirido o estudo da tripanosomose americana, doença de Chagas ou esquizotripanose, torna muito oportuna a descrição dos métodos de laboratorio applicaveis ao diagnostico da enfermidade, dentre os quais os mais importantes e decisivos são, sem duvida, aqueles que visam a demonstração, direta ou indireta, do *Schizotrypanum cruzi* no sangue do homem ou dos animais.

Processo indireto dos mais recomendaveis é a « prova do barbeiro » ou xenodiagnostico, que consiste em verificar-se si barbeiros « puros » infectam-se após haverem sugado o sangue de um suposto portador.

No presente trabalho tencionamos dar uma descrição pratica e detalhada deste método que, proposto por Brumpt em 1914, vem encontrando cada vez maior applicação por parte dos pesquisadores e clinicos que lidam com a tripanosomose de Chagas.

INSETOS

A primeira condição para o emprego rigoroso do xenodiagnostico é a garantia da pureza dos insetos utilizados, os quais devem provir de criação no laboratorio e ser completamente isentos de qualquer infecção por flagelados. Do cultivo das principais especies de barbeiro, que é facilmente conseguido e mantido, tratámos especialmente em trabalho anterior (Dias, 1938).

Para constante garantia da pureza de uma criação de reduvidos julgamos indispensaveis as seguintes normas: 1.^a) empregar para alimentação animais de laboratorio ainda não usados, de preferencia pombo ou cobaio; 2.^a) nunca readmitir na criação barbeiros que tiverem estado em contacto com pessoas ou animais possivelmente infectados, mesmo quando aparentemente não tenham ingerido sangue suspeito; 3.^a) nunca introduzir na criação insetos de outra procedencia; 4.^a) controlar

* Recebido para publicação a 18 de Março de 1949 e dado á publicidade em Agosto de 1940.

periodicamente os barbeiros, examinando-lhes as dejeções ou o conteúdo intestinal.

Verificado em um unico barbeiro a existencia de flagelados, o *stock* de onde ele proveio estará perdido para fim de xenodiagnostico, devendo a criação ser recomeçada a partir de ovo. Tal eventualidade nunca ocorreu em nosso laboratorio, onde ha anos mantemos criações normais, observando estritamente as normas acima.

A *especie* de reduvideo a ser utilizada não é indiferente, pois já verificámos que especies diversas podem ter receptividade variavel para diferentes amostras de *Schizotrypanum cruzi*. Assim, não só foi demonstrado que uma amostra brasileira deste parasito infectava *P. megistus*, *E. sordida* e *T. infestans* em percentagens significativamente maiores do que *Rhodnius prolixus* (Dias, 1939), como tambem amostras venezuelanas de *S. cruzi* evoluíram em maior percentagem de *Rhodnius prolixus* normais, do que em *Panstrongylus megistus* e *Triatoma infestans*. *Deve preferir-se, para o xenodiagnostico em determinada região, uma especie local, ou melhor, o transmissor natural mais importante da molestia, nessa região.*

A *idade* mais conveniente dos barbeiros destinados á prova deve ser média — « larvas já de certo tamanho ou ninfas, não só pela quantidade relativamente grande de sangue que já podem sugar, como pela pequena mortalidade nessa fase e o longo tempo que podemos esperar para sua observação » (Dias, 1936, p. 107).

Numero — Afim de que sejam maiores as possibilidades de se conseguirem resultados positivos, ou de que tenham maior significação os resultados negativos, devemos procurar usar em cada prova sempre um certo numero de barbeiros. Via de regra usam-se de cada vês 3 a 6 exemplares, podendo o numero aumentar ou diminuir conforme o interesse do momento.

Larvas vacias e famintas devem ser de preferencia escolhidas para uso, pois terão maior probabilidade de realisarem uma sucção mais rapida e mais completa do que as ainda parcialmente cheias. E' muito facil reconhecer-se quando o barbeiro está apto a sugar em dado momento: introduzindo-se o dedo por algum tempo no recipiente onde eles se acham, os mais famintos logo se aproximam estirando a tromba, sendo então recolhidos.

APLICAÇÃO

Ha diversas maneiras simples de se collocarem os barbeiros de prova para sugar, podendo eles ser postos diretamente sobre a pele, livres ou

encerrados em um recipiente qualquer. Dispositivos praticos, adaptações de outros empregados na alimentação de piolhos e de carrapatos, podem ser facilmente improvisados, como os que se vêem nas figuras 1 e 2 da estampa 1. Constam estes dispositivos de uma caixa de papelão fechada de um lado por uma tampa (de rosca preferentemente) e do outro por dupla camada de gaze segura por esparadrapo; o lado da gaze fica mantido fixo de encontro á péle do doador por meio de barbantes ou de tiras de pano. Os reduvideos realizam facilmente a refeição hemática nestas condições, que favorecem além de tudo a possibilidade da aplicação ao abrigo das vistas dos circunstantes ou mesmo das do proprio paciente.

O tempo de aplicação deve ser o bastante para permitir que os insetos se encham completamente de sangue. Quando varios barbeiros são usados a refeição dura em geral de 15 a 30 minutos. Tanto quanto possivel deve-se prolongar o contacto, quando se observa que os insetos insuficientemente cheios continuam a sugar ou procuram de novo introduzir a tromba. Naturalmente, maior o grau de repleção, melhor para o resultado da prova.

CONSERVAÇÃO

Após a sucção recolhem-se os barbeiros cheios para o interior de tubos de mosquito (est. 2, fig. 1), tubos de ensaio ou de Borrel, onde vão aguardar exame. Fecham-se estes todos com rolha de cortiça, com algodão, ou melhor, com gaze dupla segura por elastico; esta ultima tem a vantagem de facilitar a evaporação das dejeções, cuja acumulação chega ás veses a danificar os reduvideos. Dentro dos tubos colocam-se tiras de papel de filtro ou de jornal dobradas, ás quais os insetos aderem.

Rótulos externos devem conter as indicações necessarias, como numero de ordem, indicação de pessoa ou animal, data, local, etc. Não é recomendavel que muitos exemplares sejam conservados juntos em pequenos recipientes.

Dos barbeiros aplicados, sómente os que nitidamente se encheram de sangue devem ser separados para exame; os que apenas sugaram pouco e os que nada sugaram não devem ser nem aproveitados na prova nem voltar para junto dos barbeiros puros. Tornam-se *suspeitos* e como tal devem ser conservados á parte ou ser destruidos.

EXAME

Quanto tempo após a aplicação devem ser examinados os barbeiros? O intervalo variará, conforme as circunstancias. Tratando-se de infecções relativamente intensas, alguns dias bastarão; mas nas infecções

pobres um prazo mais longo é necessario, afim de que os raros parasitos ingeridos possam se multiplicar a ponto de se tornarem mais facilmente encontraveis no conteúdo intestinal dos insetos.

Adotamos como regra nunca dissecar os barbeiros antes de decorrido 1 mez e consideramos tempo ótimo entre o 40.º e o 60.º dia. Um intervalo excessivamente longo não é recomendavel, pois com o correr do tempo a infecção pode desaparecer espontaneamente, conforme já tem sido observado (cf. Dias, 1934 *a*, 1936 *a*, 1936 *b*, Dias & Romaña, 1939). Quando necessario, os barbeiros de prova devem ser alimentados em animal indene, para poderem esperar, em boas condições, o momento da disseccção.

Varias são as maneiras de se pesquisar o parasitismo nos barbeiros. O *exame das dejeções* a fresco, entre lamina e laminula, é a mais simples, mas apresenta o inconveniente da incerteza da obtenção do material no momento desejado. As dejeções podem ser mais seguramente obtidas encerrando-se barbeiros dentro de placas secas, logo depois de alimentação em animal normal. A tecnica da *punção retal* permite a qualquer instante a obtenção do conteúdo do intestino posterior, sem o sacrificio do inseto; foi por nós anteriormente descrita (Dias 1936) e consiste simplesmente na introdução da extremidade de uma pipeta capilar no orificio anal (est. 2, fig. 2). A pipeta é feita com a parte fina de pipetas estiradas comuns e sua ponta deve ser bem afilada, para poder ser introduzida sem dano. Uma vés introduzida (a pequena profundidade, devido ao curto diametro da empôla retal) o material penetra por capilaridade; uma ligeira pressão sobre o abdome favorece a obtenção do material, que será examinado em natureza ou após diluição em sôro fisiologico. Todo cuidado deve ser tomado ao se introduzir a pipeta, para que ela não rompa o revestimento externo e penetre na cavidade geral e não no réto; a punção da cavidade geral fornecera hemolinfa, que será reconhecida ao microscopio pela presença de células (amebocitos). A punção retal é mais facilmente praticada em ninfas e larvas do que em adultos, e, quando realisada em boas condições, é perfeitamente inócua. Algumas veses a simples compressão abdominal fez com que o conteúdo retal seja expelido.

Disseccção — Nos casos em que se deseje a verificação definitiva de um resultado, ou em que não haja interesse na conservação dos barbeiros em estado vivo, é indicada a disseccção. Esta é muito facil, em razão do tamanho dos reduvidos, e tem por fim a retirada de parte do tubo digestivo para confecção de preparados. Deve ser examinado de preferencia o duódeno, ou porção intestiniforme do mesenteron, que é a porção tubular adelgada intermediaria entre o estomago e a em-

pôla retal (est. 2, fig. 3). E' no duodeno que os parasitos, sob a fórmula de critidia, se multiplicam mais intensamente e mais precocemente.

Um modo comodo de proceder á dissecção é o seguinte: Segurando-se o barbeiro pelo tórax com uma pinça curva, corta-se a tesoura a margem do conexivo, separando-se as folhas quitinosas dorsal e ventral do exoesqueleto. Pela retirada da folha dorsal ficam a descoberto os órgãos internos in loco. Com outra pinça puxa-se para cima de uma lamina, o estomago, que se destaca facilmente pela ruptura do esofago, e distende-se com cuidado o duodeno. Pode-se então retirar este ultimo em todo ou em parte, seccionando-o em dois pontos e transportando-o para lamina onde será feita a diluição do conteúdo para exame. Esta tecnica permite o exame do material mais apropriado livre o mais possivel de impurezas e detritos, e tem ainda a vantagem de deixar o intestino posterior intacto dentro da carcassa do inseto. Sendo positivo o exame e desejando-se praticar inoculação em animal, estará preservada a ultima porção do tubo digestivo, na qual se encontram as formas infectantes do flagelado. Com alguma pratica, consegue-se sem nenhuma dificuldade a obtenção de material puro de cada um ou de todas as principais porções do conduto intestinal dos reduvideos.

REGISTRO DAS PROVAS

Para registro das provas de xenodiagnostico e dos seus resultados é vantajoso o emprego de um caderno impresso em cujas paginas encontram-se as principais indicações a serem preenchidas, referentes ao paciente, aos insetos utilizados e aos resultados dos exames. O modelo abaixo é por nós usado, em cadernos de 200 paginas com duas fichas em cada uma.

XENODIAGNOSTICO

No..... Data.....
 Nome.....
 Local.....
 Obs.....
 Exame..... Data.....

Resultado

Especie	Positivos	Negativos	o/o	†
<i>P. megistus</i>				
<i>T. infestans</i>				
<i>R. prolixus</i>				

COMPARAÇÃO COM OUTROS PROCESSOS INDIRETOS

O xenodiagnostico, além de ser de facil applicação, fornece resultados bastante seguros. Sensibilidade e simplicidade, são as duas vantagens basicas do processo, cuja principal desvantagem consiste no tempo que tardam os resultados a serem verificados. Este inconveniente, entretanto, é comum a todos os meios de pesquisa indireta do *Schizotrypanum cruzi*; aos quais temos que recorrer depois de exgotados os recursos dos exames diretos do sangue, a fresco ou em gotas espessas: a inoculação em animal e a cultura *in vitro*.

Destes tres processos indiretos, qual oferece maiores vantagens de praticabilidade?

Parece evidente que o xenodiagnostico é o que maiores vantagens reúne, para uma applicação pratica em maior ou menor escala. Barbeiros normais para prova são facilmente conseguidos, quer de criações feitas a proposito, quer de Instituições ou Laboratorios onde numeroso stock pode ser sempre mantido; o transporte dos insetos é o mais facil possivel, podendo os interessados receber pelo correio os exemplares de que necessitem. A applicação dos hemipteros é a mais simples possivel, bem como sua conservação á espera de exame, o qual por sua vês não oferece dificuldades maiores. As facilidades de criação ou obtenção, de transporte, de applicação, de conservação e de exame dos barbeiros, fazem do xenodiagnostico o meio de mais pratica applicação, em grande escala sobretudo. Com ele não podem rivalisar a inoculação nem a cultura, cujo emprego oferece na pratica tanto maiores dificuldades quanto maior fôr a extensão que se dê ou que se procure dar ás investigações.

A inoculação, que tem sobre o xenodiagnostico a vantagem aparente de permitir a pesquisa de parasitos em maiores volumes de sangue, oferece entretanto maior numero de inconvenientes, como a dificuldade de transporte, de manutenção e de exame, que apresentam os animais de experiencia e que são sem duvida maiores do que as apresentadas pelos barbeiros. Além disto, nem sempre é facil a escolha do animal mais adequado á inoculação, que além das variações especificas oferece variações individuais de sensibilidade á infecção. A variação de virulencia do germen, não só de amostras diversas como da mesma amostra, é outro fator que se deve levar em conta: a par das inoculações que determinam infecções intensas e mais ou menos facilmente evidenciaveis, ha as que são ligeiras e fugazes, sómente demonstraveis por buscas diretas reiteradas e prolongadas, e as « cripticas », que escapam

ainda a essas buscas, necessitando por seu turno a aplicação de processos indiretos de evidenciação.

A cultura *in vitro*, que até certo ponto pode ser comparavel ao xenodiagnostico (xenocultivo), é muito inferior a este, sobretudo pela facilidade de contaminação bacteriana dos meios, que impede muitas vezes a observação dos resultados.

A cultura e a inoculação em animal são métodos que mais convêm dentro do laboratorio. O xenodiagnostico é o método mais pratico e mais conveniente ás investigações epidemiologicas extensas.

O xenodiagnostico é um processo natural de diagnostico. Com ele, procuramos repetir o que se passa na natureza, infectando os barbeiros na sua fonte habitual, que é o sangue dos vertebrados. Conforme já tivemos ocasião de dizer, o *indice de infestação dos reduvidos em determinado local representa como que o resultado de um « xenodiagnostico » natural* (Dias 1936, p. 91). A grande susceptibilidade dos barbeiros ao desenvolvimento do *S. cruzi* fez com que Brumpt os qualificasse de « merveilleux hôtes vecteurs ».

« Un tel résultat vient donc démontrer la réelle utilité de la méthode de diagnostic proposée par Brumpt, méthode dont l'emploi est indispensable dans des zones où l'on veut déterminer, par le diagnostic étiologique, la proportion de porteurs, humains ou animaux, du *Schizotrypanum cruzi* » — tal foi nossa conclusão (Dias, 1934 *b*) ao cabo dos primeiros ensaios que empreendemos em Lassance, que repetidas e variadas pesquisas ulteriores não fizeram senão confirmar.

SUMARIO

O xenodiagnostico é um processo muito valioso para o diagnostico etiologico da molestia de Chagas. Consiste em alimentar-se barbeiros normais em supótos portadores da infecção e determinar-se, depois, si eles adquirem ou não o parasitismo. Em cada região deve ser empregada, de preferencia, o transmissor local mais importante. Tres a seis ninfas famintas são geralmente empregadas em cada próva, devendo ficar em contacto com o doador até encherem-se completamente (15-30 minutos). Si o exame de fezes — espontaneamente eliminadas ou obtidas por punção anal — não revelar a presença de flagelados, os inséto devem ser dissecados 40 a 60 dias depois da sucção, para exame do conteúdo duodenal.

SUMMARY

Xenodiagnosis is a very valuable method for the etiological diagnosis of Chagas' disease. It consists in allowing the clean insect transmitter to feed upon the suspected carrier, and in ascertaining whether the bugs become infected. The principal local vector is the most suitable species to be used in a given region. Three to six hungry nymphs are usually employed in each test and must feed until repletion (15-30 minutes). If flagellates are not detected in the faeces or in the rectal contents, obtained by anal puncture, insects are dissected 40-60 days after the « infective meal » and the duodenal contents is examined.

BIBLIOGRAFIA

BRUMPT, E.

1914. Le xenodiagnostic. Application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier à la trypanosômose de Chagas. Bull. Soc. Pat. Ex., **7** : 706.

DIAS, E.

- 1934 *a*. Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, **28** (1) : 1-111.
1934 *b*. Le xéodiagnostic appliqué à la trypanosomiase américaine. C. R. Soc. Biol., **118** : 287-289.
1936 *a*. Xenodiagnostico e algumas verificações epidemiologicas na molestia de Chagas. IX Reunião Soc. Argentina Pat. Regional, **1** : 89-119.
1936 *b*. Revisão geral dos hemoflagellados de Chirópteros. Idem, **1** : 10-88.
1938. Criação de Triatomideos no laboratorio. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, **33** (3) : 407-412.
1939. Chagas' disease: A comparative study of the susceptibility of four natural vectors to the experimental development of *Schizotrypanum cruzi*. Third International Congress for Microbiology, New York. Abstracts of communications : 164.

DIAS, E. & ROMANA, C.

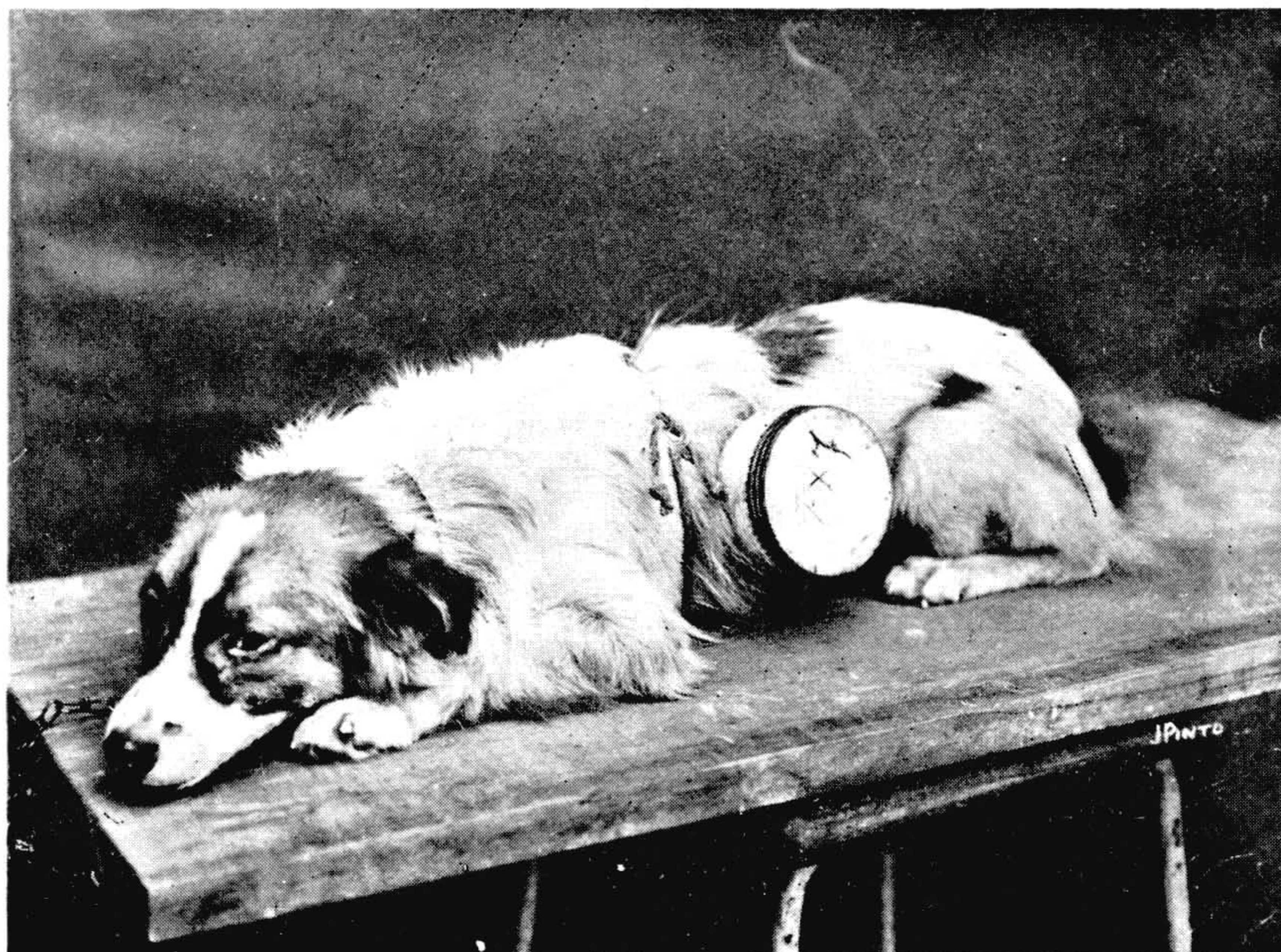
1939. Algumas investigações sobre *Schizotrypanum* de Quirópteros. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, **34** (4) : 619-625.

Estampa 1

- Fig. 1 — Aplicação de barbeiros em caso cronico de molestia de Chagas (Teodora Beatriz). Dispositivo improvisado.
Fig. 2 — Aplicação de barbeiros em cão, por meio de dispositivo improvisado.



1

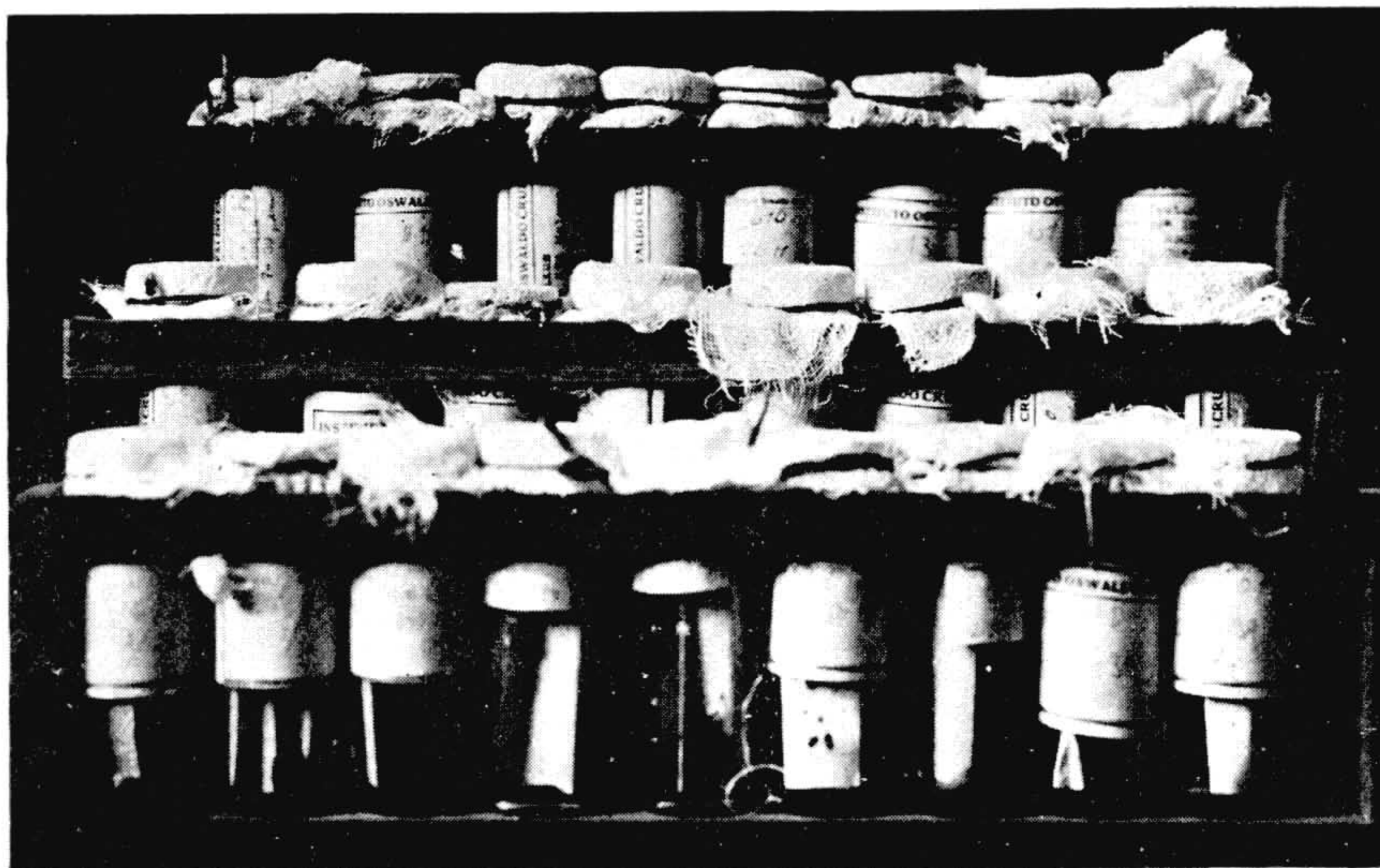


2

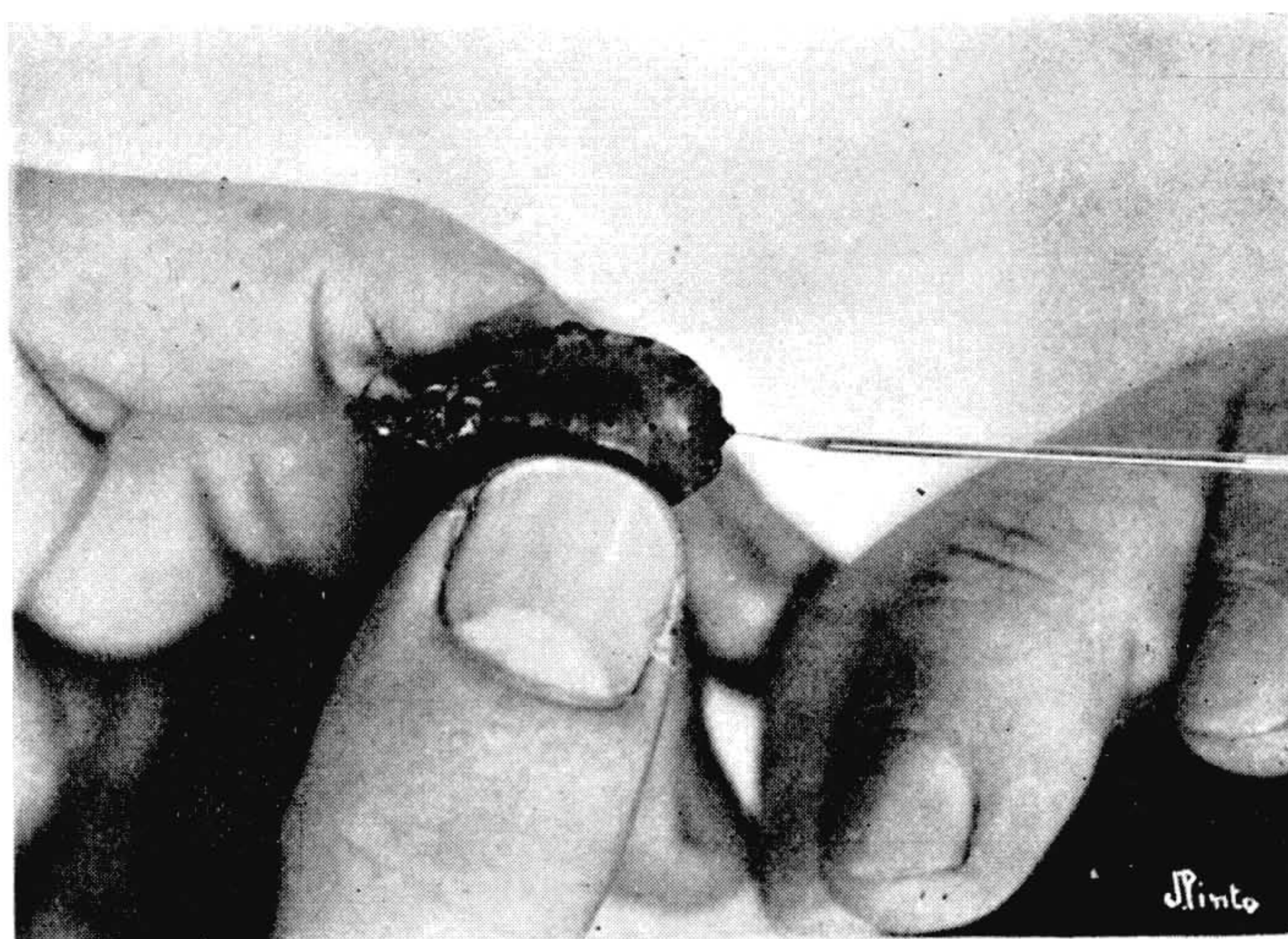
Dias: Xenodiagnostico na molestia de Chagas.

Estampa 2

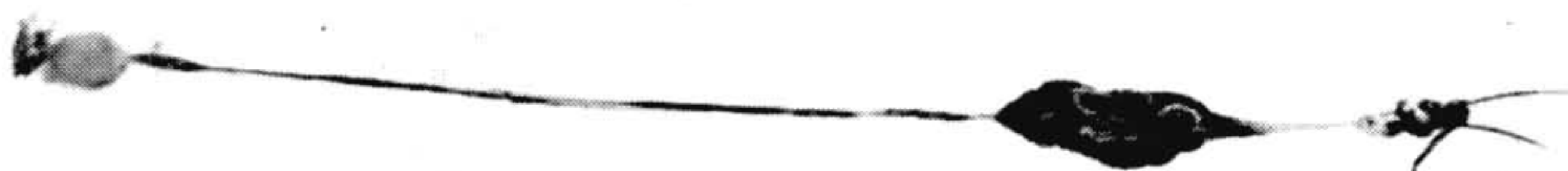
- Fig. 1 — Conservação dos insetos após a aplicação.
- Fig. 2 — Prática da punção anal em ninfa de *P. megistus*.
- Fig. 3 — Preparação de tubo digestivo de *P. megistus*, distendido. Porção dilatada próxima á cabeça = estomago; porção tubular alongada = duodeno; porção ampular terminal = réto ou intestino posterior. Segundo Dias, 1934 *a*.



1



2



3

Dias: Xenodiagnostico na molestia de Chagas.