

ESTUDOS SOBRE A PERSISTÊNCIA DE INFECTIVIDADE DO TRYPANOSOMA CRUZI. I Efeito da temperatura sobre a infectividade de flagelados da amostra Perú de *T. cruzi* obtidos de fezes de triatomíneos.

N.J. Alvarenga e P.D. Marsden*

*An investigation was made about the influence of environment temperature on the infectivity of flagellate of *T. cruzi* Peru sample in triatomine feces by periconjunctival instillation in albino mice. The results demonstrate that infection, measured by patent parasitemia decreases when fecal suspension is maintained at 30°C. The possible implication of these findings in relation to transmission of *T. cruzi* to human, in field, is briefly discussed.*

INTRODUÇÃO

O motivo desta investigação surgiu como resultado de observações feitas em duas casas em São Felipe, Bahia, onde havia alta porcentagem de triatomíneos infectados.

Na primeira casa (Sapezinho 7), de 74 triatomíneos de todos os estágios, dissecados, 70,3% apresentavam-se infectados por *T. cruzi*. Na família aí moradora, mãe e pai apresentavam sorologia positiva e xenodiagnóstico negativo. De seus seis filhos, três nas idades de 13, 12 e 4 anos apresentaram xenodiagnóstico e sorologia positivos e dois, um de 2 anos e outro de seis meses, apresentaram resultados negativos para estas investigações. Entretanto, enquanto a família estava sendo investigada, uma filha de 7 anos de idade apresentou-se com fase aguda da doença de Chagas, tendo sinal de Romaña, febre e parasitemia patente. Sua sorologia inicialmente negativa converteu-se durante a fase aguda em positiva. Portanto, ao que tudo indica, ela viveu por 7 anos nesta casa infestada por triatomíneos sem se infectar.

Uma situação semelhante foi observada em outra residência (Genipapo 70), onde uma menina de 9 anos apresentou sinal de Romaña e fase aguda da doença de Chagas. De seus seis irmãos, três apresentaram Xenodiagnóstico positivo (com 10,5 e 4 anos) sendo que em três (com 11, 4 e 2 anos) este teste foi negativo. Dos 177 triatomíneos, de todos os estágios obtidos nesta casa 64,4% estavam infectados por *T. cruzi*. Mais uma vez, a menina com fase aguda tinha vivido na casa toda sua vida.

Os dois exemplos demonstram que pelo menos em alguns casos, não é fácil adquirir a doença de Chagas. Estórias que referem infecções adquiridas após dormir uma única noite em casa infestada (Darwin, por exemplo) parecem ser raras.

Podemos considerar duas hipóteses para explicar esta observação no campo. A primeira seria que as crianças em questão diferem, de alguma forma, de seus parentes no que diz respeito à capacidade de aquisição da doença de Chagas. Teoricamente isto é viável; contudo, não foram feitas investigações a respeito. Em

* Departamento de Biologia Animal — Departamento de Medicina Especializada — Universidade de Brasília.
Recebido para publicação em 20.8.1975

segundo lugar, possivelmente algumas condições críticas são necessárias para que se efetue a transmissão. Uma possibilidade é que tais condições sejam de natureza física tais como temperatura, umidade, pH e grau de dessecação das fezes sobre a superfície da pele do homem. O fator tempo pode ser crítico nestas condições; por exemplo, um triatomíneo defecando às 4 horas da manhã possivelmente terá melhor chance em efetuar a transmissão da doença do que aquele que tenha se alimentado (e defecado) na pele às 11 da noite.

Até o presente, desconhecemos qualquer referência a respeito da atividade noturna dos triatomíneos nas casas ou sobre a freqüência de sua alimentação em condições naturais. Também são poucas as observações experimentais sobre o efeito de tais fatores físicos, possivelmente devido às dificuldades em reproduzir as condições físicas operantes na superfície da pele do homem em condições de campo. Wood⁸ notou que o *T. cruzi* em presença do suor humano vive por pouco tempo, mas as observações foram feitas em condições artificiais.

De uma maneira geral, os tripanosomatídeos são sensíveis às mudanças de temperatura; sabemos que o grau de variação de temperatura em São Felipe é muito grande (20 a 35°C), dependendo das condições climáticas. Pareceu-nos, portanto, razoável, como uma investigação preliminar, observar o efeito da temperatura sobre a infectividade de flagelados contidos em fezes de triatomíneos.

MATERIAL E MÉTODOS

A amostra Peru de *T. cruzi* isolada em 1963 de um caso humano⁵, foi mantida em ninfas do 3º estágio de *Rhodnius prolixus* e *Triatoma infestans*. Um grupo de tais triatomíneos foi dissecado com um tempo superior a 20 dias após o repasto infectante em camundongos infectados e o conteúdo do reto e intestino terminal foram misturados em salina normal. Deste "pool" de fezes foi retirada uma amostra e os flagelados vivos foram contados em câmara de Neubauer. Desta forma pode-se calcular o número de parasitas contidos em 0,05 ml, dose de inóculo. Fez-se também distinção entre epimastigotas e tripomastigotas.

A suspensão foi então dividida em partes iguais em seringas de plástico e mantidas em estufas com temperatura ambiente (23-25°C), a 30°C e a 37°C por períodos de tempo variados. As suspensões eram agitadas antes de serem usadas nos camundongos.

Para realizar a infecção, adotou-se a técnica de Marsden⁴. Uma seringa graduada de 1 ml (Yale microlance) com agulha nº 10/45 preenche um volume de 0,10 ml com 15 gotas. Desta forma, foram instiladas gotas nas conjuntivas de camundongos albinos, Suíço 40, machos pesando de 15 a 20g. sem traumatizar os animais. Os camundongos foram anestesiados com Pentabarbital e expostos à infecção em lotes de dez. Estes animais foram mantidos em gaiolas de zinco onde recebiam alimentação e água "libatum". As condições não eram ideais para manutenção dos camundongos, portanto foram estabelecidos controles de manipulação e estabilidade que eram observados rotineiramente. A mortalidade dos controles manipulados expostos ao corte de cauda e manuseio atingiu a 20%. Nos controles de estabilidade, onde se observou o efeito de manutenção nas referidas gaiolas, a mortalidade atingiu a 10%.

Para verificação da infectividade do inóculo o método usado foi o de se proceder ao exame de sangue colhido da cauda dos animais formando um filme de uma camada entre lâmina e lamínula. Estes exames foram feitos aos 14, 21 e 28 dias após o inóculo. Nos últimos experimentos a leitura relativa ao 28º dia foi omitida em vista do que não se conseguiu detectar nenhuma infecção neste período em 93 camundongos examinados. 100 campos, num aumento de 400 X, eram examinados anotando-se a presença ou não de tripanosomas. Os camundongos positivos eram imediatamente isolados do resto dos animais do grupo.

Um problema não solucionado com este tipo de experimento é o de se saber quantos camundongos se infectaram e não exibiram parasitemia. Tentamos fazer esta estimativa por testes de hemaglutinação ou fixação de complemento em camundongos que não haviam apresentado parasitemia anteriormente, mas os resultados não foram reproduzíveis. Portanto, na Experiência VII, foi feita uma reinoculação com formas sangüíneas da amostra Peru, que normalmente é letal. A sobrevivência dos camundongos reinoculados possivelmente sugeriria que eles teriam desenvolvido imunidade como resultado de uma infecção não detectada, devida ao primeiro inóculo.

RESULTADOS

Ao todo, foram realizados 7 experimentos, usando um total de 660 camundongos; apenas no sétimo experimento houve obtenção de resultados estatisticamente significativos mostrados na Tabela I.

Após exposição a 30°C por 9 horas a suspensão mostrou um declínio na infectividade, o que é altamente significativo.

Nenhum camundongo foi infectado com material mantido a 37°C, confirmando os outros experimentos. Todos os outros experimentos

mostraram um padrão semelhante, mas devido à variabilidade da infectividade das suspensões usadas, não se obtiveram resultados significativos. Pode-se verificar que a infectividade de uma suspensão não guarda uma estreita relação com o concentração de flagelados.

TABELA I

Experiência 7 — Efeito de três temperaturas diferentes sobre a infectividade de fezes de triatomíneos, sendo tomada a medida pelo desenvolvimento de parasitemia patente nos camundongos.

Temperatura °C	Tempo de exposição das fezes a esta temperatura	Dias de exame dos camundongos		Total de infectados	%
		14	21		
24	1h	5/10*	0/5	5/10	50
24	9h	17/50	3/33	20/50	40
30	9h	1/47	1/46	2/47	4,3
37	9h	0/36	0/36	0/36	0

* Número de camundongos infectados/número examinado.
Inóculo de 1.733 tripomastigotas.

A Tabela 2 mostra os resultados de um experimento de reinoculação em três grupos de camundongos que não apresentaram parasitemia no experimento 7 e um pequeno grupo de camundongos não inoculados. O reinóculo foi administrado intraperitonealmente 23 dias depois do inóculo inicial. A total mortalidade do grupo controle e do grupo que recebeu inóculo de material mantido a 37°C confirma a letalida-

de da amostra Peru quando o inóculo é de formas sangüíneas mantidas por 16 passagens de camundongo a camundongo. A média de 10% de sobrevivência nos grupos de camundongos de material a 24°C e 30°C indica uma imunidade à mortalidade desta ordem. Todos os cinco camundongos sobreviventes apresentaram uma baixa parasitemia 30 dias após o reinóculo.

TABELA II

Resultados do reinóculo de camundongos que não apresentaram parasitemia após inóculo na conjuntiva com fezes de triatomíneos infectados, mantidas em diferentes temperaturas por 9 horas, grupo controle e camundongos que foram infectados.

Temperatura do inóculo conjuntival	Número de camundongos por grupo	Número de camundongos sobre- viventes 30 dias após	Porcentagem de sobrevivência
24	30	3	10%
30	11	3	7%
37	19	0	0
Controle	15	0	0
Camundongos infectados na exp. nº 7	6	6	100%

Inóculo de 2×10^5 tripomastigotas da Amostra Peru.

DISCUSSÃO

Dos resultados obtidos fica claro que a temperatura exerce influência sobre a infectividade do *Trypanosoma cruzi* em fezes de triatomíneos e que também esta influência se torna evidente quando suspensões fecais são expostas a temperatura (30°C) de somente 6°C acima da temperatura ambiente por tempo relativamente curto (9 horas). É sabido que outros membros da família Trypanosomidae, causadores de doenças no homem, são sensíveis a mudanças de temperatura. Isto é visto no trabalho de Lemma e Schiller² em culturas de três espécies de leishmanias humanas, nos trabalhos de Trejos e cols⁷ e Lugo Hernandez³ com *Trypanosoma cruzi* em cultura de tecidos. Todos estes estudos sugerem que a temperatura é um fator importante que influencia, morfológicamente, na mudança de uma forma a outra. Não estamos certos de como a temperatura afetou o *T. cruzi* em nosso experimento, mas um exame microscópico da suspensão fecal após as nove horas de incubação mostrou ausência de flagelados vivos à temperatura de 37°C e uma redução do número de organismos viáveis em material mantido a 30°C. É nossa intenção investigar quantitativamente este aspecto, mas parece que tais temperaturas têm efeito letal sobre formas de *T. cruzi* encontradas em suspensões de fezes de triatomíneos.

É provável que a temperatura ambiente, atuando sobre a superfície da pele, seja um fator limitante na transmissão da doença de Chagas na natureza. Uma de nossas dificuldades em investigar tal ponto de vista está em reproduzir um modelo onde o complexo superfície da pele e meio ambiente possam ser regulados. Fatores que operam na superfície da pele, tais como variação de pH e dessecação, foram eliminados em nosso experimento, pois uma seringa

de plástico é muito diferente da superfície da pele.

Outros fatores importantes para que uma pessoa venha a se infectar são a natureza do inóculo em termos de densidade e tipos de flagelados e sua infectividade. Em tripanosomiase africana experimental humana foi mostrado que a dose mínima infectante era da ordem de 300 a 450 tripanosomas metacíclicos¹. No caso de doença de Chagas não se tem este tipo de informação por razões éticas. Entretanto, acredita-se que somente tripomastigotas sejam infectantes.

Em alguns experimentos realizados no decorrer deste trabalho, algumas vezes ficamos surpreendidos pelo fato de que inóculos de baixa densidade de flagelados produziam infecções patentes após instilação na conjuntiva.

Os resultados do reinóculo sugerem que uma infecção não detectada ocorra em aproximadamente 10% dos animais inoculados. Nestes animais a parasitemia não foi observada em exames feitos aos 14 e 21 dias após o inóculo e sabemos por trabalho anterior, que uma sólida imunidade à amostra Peru é desenvolvida após 21 dias de inóculo por uma amostra não letal de *T. cruzi*⁶. Não temos, entretanto, dados sobre o desenvolvimento de imunidade após o tipo de inóculo empregado neste trabalho, sendo este assunto investigado no momento.

AGRADECIMENTOS

Desejamos agradecer ao Prof. Mauricio P. Gama pelo auxílio no tratamento estatístico dos dados; aos Drs. Isaac Roitman e Aluizio Prata pelas facilidades fornecidas para realização deste trabalho; ao Conselho Nacional de Pesquisas pela bolsa concedida e aos estagiários Dalva N. Costa e Carlos Costa pela colaboração prestada.

SUMMARY

An investigation was made about the influence of environment temperature on the infectivity of flagellate of T. cruzi Peru strain in triatomine feces by periconjunctival instillation in albino mice. The results demonstrate that infection, measured by patent parasitemia decreases when fecal suspension is maintained at 30°C in comparison with that maintained at 24°C. Mice had not been infected at 37°C. The possible implication of these findings in relation to transmission of T. cruzi to human, in field, is briefly discussed.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FAIRBAIN, H. & BURTT, E. — The infectivity to man of a strain of *Trypanosoma rhodesiensi* transmitted cyclically by *Glossina morsitans* through sheep and antelope: evidence that man requires a minimum infecting dose of metacyclic trypanosomes. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 40:270, 1946.
2. LEMMA, A. & SCHILLER, E.L. Extracellular cultivation of the Leishmanial bodies of species belonging to the genus *Leishmania*. *Expl. Parasitol.* 15:503-13, 1964.
3. LUGO-HERNANDEZ, A. Morfologia de *Trypanosoma cruzi* en celulas de pollo y lagartos (*Tropidurus hirpidus*, Sauria: Iguanidae) cultivada a 37°C. *Rev. Brasil. Biol.* 33:561-74, 1973.
4. MARSDEN, P.D. *Trypanosoma cruzi* infections in CF1 mice. The capability of flagellates obtained from two sources (bug faeces and mouse blood) to induce patent infection on perconjuntival instillation. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 63:309-11, 1969.
5. NUSSENZWEIG, V. & GOBLE, F.C. Further studies on the antigenic constitution of strains of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi*. *Expl. Parasitol.* 18:224, 1966.
6. SEAH, S. & MARSDEN, P.D. The protection of mice against a virulent strain of *Trypanosoma cruzi* by previous inoculation with an avirulent. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 63:211-14, 1969.
7. TREJOS, A.; GODOY, G.A.; GRENBLATT, C. & CEDILLOS, R. Effects of temperature on morphologic variation of *Schizotrypanum cruzi* in tissue culture. *Expl. Parasitol.* 13:211-18, 1963.
8. WOOD, S.F. Survival time of metacyclic *Trypanosoma cruzi* in human sweat. *J. Parasitol.* 39, 569-70, 1953.