

NOTAS E INFORMAÇÕES/NOTES AND INFORMATION

COMPARAÇÃO ENTRE DUAS TÉCNICAS SOROLÓGICAS APLICADAS AO ESTUDO DO SANGUE INGERIDO POR TRIATOMÍNEOS

José Carlos Rehder de Andrade *
Eduardo Olavo da Rocha e Silva **
José Maria Pacheco de Souza ***

RSPU-B/291

ANDRADE, J. C. R. de et al. — *Comparação entre duas técnicas sorológicas aplicadas ao estudo do sangue ingerido por triatomíneos. Rev. Saúde públ., S. Paulo, 9:539-45, 1975.*

RESUMO: *Comparou-se a técnica de reação de precipitina em tubos capilares com a de imunodifusão em gel de agar, em papéis contendo sangue de aves (galos) ingerido por triatomíneos. Usaram-se 360 T. infestans e 270 P. megistus, estudando-se também a mortalidade comparativa das duas espécies. Os resultados sugerem que o método capilar apresenta ligeira vantagem. Quanto à mortalidade, a resistência ao jejum do T. infestans foi uniforme durante todo o tempo de observação, enquanto que, para o P. megistus a força de mortalidade foi pequena até o 50º dia de jejum, aumentando acentuadamente a seguir.*

UNITERMOS: *Técnicas sorológicas. Tripanossomíase americana. Triatomíneos.*

1 — INTRODUÇÃO

Tendo em vista a importância epidemiológica do levantamento dos índices médios de sangue humano ingerido pelos triatomíneos, capturados no intradomicílio em diferentes áreas do Estado de São Paulo, a Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), há algum tempo^{1,2} vem utilizando, como rotina, a reação de

precipitina em tubos capilares³, com as modificações propostas por Siqueira⁴. No entanto, após os estudos de Ricciardi e Mello⁵ mostrando as vantagens de imunodifusão em gel de agar (Ouchterlony), surgiram dúvidas sobre qual das técnicas utilizar como padrão, pois que somente através dos trabalhos de rotina, não pa-

* Da Superintendência de Controle de Endemias da Secretaria da Saúde de São Paulo (SUCEN) — Rua Tamandaré, 649 — São Paulo, SP — Brasil.

** Da SUCEN e do Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da USP — Av. Dr. Arnaldo, 715 — São Paulo, SP — Brasil.

*** Do Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da USP — Av. Dr. Arnaldo, 715 — São Paulo, SP — Brasil.

receu possível uma conclusão segura. Realizou-se, então, um experimento comparativo entre as citadas técnicas, utilizando-se, para tanto, o conteúdo do intestino de triatomíneos, alimentados somente em aves, testado frente ao respectivo anti-soro, de dez em dez dias, a partir da data da última alimentação. Paralelamente, procurou-se observar a mortalidade em função do tempo de jejum.

2 — MATERIAL E MÉTODOS

2.1 — Amostragem e colheita do material

Foram selecionados 630 exemplares de triatomíneos no 5.º estágio, sendo 360 ninfas do *Triatoma infestans* e as 270 ninfas restantes, do *Panstrongylus megistus*. Todas procedentes do Insetário da SUCEN (Moji-Guaçu) e alimentadas somente em aves (galos). Após o último repasto, os exemplares visivelmente alimentados foram sorteados, formando 24 grupos de 15 para *T. infestans* e 27 grupos de 10 para o *P. megistus*. A seguir foram colocados em caixas circulares de papelão, com diâmetro de 8 cm e altura de 3,5 cm, fechadas com filó de algodão, elástico e esparadrapo. Após numeradas, as caixas retornaram ao citado Insetário.

As datas previamente estabelecidas para exame do material contido no intestino desses triatomíneos, foram fixadas para intervalos de dez em dez dias, contados a partir da data da última alimentação. Foram submetidos aos testes, de cada vez, os exemplares contidos em 2 caixas contendo *T. infestans* (30 exemplares) e 3 caixas com *P. megistus* (30 exemplares), previamente sorteadas, do total geral de 24 e 27 caixas, respectivamente.

Aos 120 dias (12 sessões de exames) completaram-se todos os exames para o *T. infestans* e aos 90 dias, para o *P. megistus* (9 sessões).

Em cada uma das datas aprezadas para os exames (1.ª sessão), as caixas previamente sorteadas eram abertas e o material do conteúdo intestinal de cada um dos “barbeiros”, transferido por expressão para papel de filtro, com o auxílio da pinça e lâmina de microscopia. No próprio papel de filtro (qualitativo Klabin), eram anotados o estágio evolutivo e aquilo que se convencionou chamar de “estado” em que se apresentava o exemplar, ou seja, morto seco (triatomíneo morto, sem material para teste); morto (triatomíneo morto, com material ainda em condições de teste); triatomíneo vivo seco (sem material para teste) e vivo (com material no intestino).

2.2 — Reação de precipitina

Vinte e quatro horas após a coleta, o papel de filtro contendo a amostra era recortado e imediatamente transferido para tubo de ensaio, ao qual era acrescentado 1,5 ml de solução salina a 0,85%. O eluato permanecia por 24 horas em geladeira, para em seguida ser examinado, inicialmente pela técnica de imunodifusão em gel de agar, utilizando-se para isso, 1,2% de Agar Oxoid para imunoeletoforesse em salina que, após fundido, era colocado na proporção de 4 ml por lâmina de microscopia. As etapas seguintes seguiram o utilizado por Ricciardi e Melo³. Quanto à técnica dos tubos capilares, seguiu-se Siqueira⁴, com modificações apenas no referente à espessura do capilar utilizado.

As leituras foram, obrigatoriamente, realizadas após 24 e 48 horas para a técnica de imunodifusão, e até completarem as 2 horas, para a técnica dos tubos capilares.

Os anti-soros utilizados, obtidos de coelhos através de inoculação subcutânea do antígeno, foram preparados segundo a técnica descrita por Weitz⁵, modificada por Siqueira⁴.

3 — RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Tabelas 1 e 3 dão informação geral sobre o comportamento dos insetos, quanto à sobrevivência em cada sessão e respectivo estado, se seco ou normal; deve-se chamar a atenção para o fato de que somente os animais "normais" permitem comparação entre as duas técnicas.

3.1 — *Comparação das técnicas de diagnóstico*

As Tabelas 2 e 4 mostram que houve um comportamento diferente entre os triatomíneos. Para o *P. megistus* as percen-

tagens de positividade acusadas pelos dois métodos em cada uma das nove sessões, foram sempre iguais (100%), com a única exceção da 6.^a, discrepância esta que pode ser perfeitamente desprezada.

Os *T. infestans* puderam ser seguidos por doze sessões; até a 5.^a sessão as técnicas apresentaram resultados absolutamente iguais, indicando sempre 100% de positividade dos insetos em condições de exame (não secos). A partir da 6.^a sessão, porém, passa a haver uma discretíssima, contudo constante, diferença em favor do método capilar, que sempre indicou um maior número de insetos positivos do que o método de imunodifusão. Os resu-

TABELA 1
Número de *T. infestans* observados, segundo sessão, sobrevivência e estado

Sessão	Sobrevivência		Mortos		Vivos		Total	
	Estado		Secos	Normais	Secos	Normais	Secos	Normais
1. ^a — 10 dias			—	3	—	27	—	30
2. ^a — 20 dias			—	2	—	28	—	30
3. ^a — 30 dias			—	3	—	27	—	30
4. ^a — 40 dias			1	—	—	29	1	29
5. ^a — 50 dias			3	2	—	25	3	27
6. ^a — 60 dias			9	1	—	20	9	21
7. ^a — 70 dias			7	—	—	23	7	23
8. ^a — 80 dias			15	—	—	15	15	15
9. ^a — 90 dias			15	—	—	15	15	15
10. ^a — 100 dias			15	—	—	15	15	15
11. ^a — 110 dias			16	1	1	12	17	13
12. ^a — 120 dias			21	—	—	9	21	9

TABELA 2

Número de *T. infestans* observados, segundo sessão, tipo de exame e positividade

Sessão	Tipo de exame	Imunodifusão		Capilar	
		Resultado			
		+	-	+	-
1. ^a — 10 dias		30	—	30	—
2. ^a — 20 dias		30	—	30	—
3. ^a — 30 dias		30	—	30	—
4. ^a — 40 dias		29	—	29	—
5. ^a — 50 dias		27	—	27	—
6. ^a — 60 dias		19	2	21	—
7. ^a — 70 dias		19	4	22	1
8. ^a — 80 dias		8	7	10	5
9. ^a — 90 dias		12	3	14	1
10. ^a — 100 dias		12	3	14	1
11. ^a — 110 dias		5	8	8	5
12. ^a — 120 dias		2	7	3	6

TABELA 3

Número de *P. megistus* observados, segundo sessão, sobrevivência e estado

Etapas, com intervalo de 10 dias	Mortos		Vivos		Total	
	Secos	Normais	Secos	Normais	Secos	Normais
1. ^a — 10 dias	—	—	—	30	—	30
2. ^a — 20 dias	—	—	—	30	—	30
3. ^a — 30 dias	—	—	—	30	—	30
4. ^a — 40 dias	—	—	—	30	—	30
5. ^a — 50 dias	—	—	—	30	—	30
6. ^a — 60 dias	—	1	—	29	—	30
7. ^a — 70 dias	2	—	—	28	2	28
8. ^a — 80 dias	—	—	—	30	—	30
9. ^a — 90 dias	16	—	—	14	16	14

TABELA 4

Número de *P. megistus* observados, segundo sessão, tipo de exame e positividade

Etapas, com intervalo de 10 dias	Imunodifusão		Capilar	
	+	-	+	-
1. ^a — 10 dias	30	—	30	—
2. ^a — 20 dias	30	—	30	—
3. ^a — 30 dias	30	—	30	—
4. ^a — 40 dias	30	—	30	—
5. ^a — 50 dias	30	—	30	—
6. ^a — 60 dias	28	2	29	1
7. ^a — 70 dias	28	—	28	—
8. ^a — 80 dias	30	—	30	—
9. ^a — 90 dias	14	—	14	—

mos dos resultados, divididos em dois períodos (arbitrariamente em função dos resultados observados), são apresentados nas Tabelas 5 e 6.

TABELA 5

Número de *T. infestans*, segundo diagnóstico e técnica de exame, nas cinco primeiras sessões

Imunodifusão \ Capilar	+	-	Total
	+	146	
-	—	—	—
Total	146	—	146

TABELA 6

Número de *T. infestans*, segundo diagnóstico e técnica de exame, nas sete últimas sessões

Imunodifusão \ Capilar	+	-	Total
	+	77	
-	15	19	34
Total	92	19	111

A Tabela 6 mostra que, nos 15 insetos em que houve discordância de diagnóstico quanto à presença de sangue, o método capilar foi aquele que acusou a devida positividade.

Parece, portanto, que o método capilar tem pequena vantagem na detecção de sangue, no *T. infestans*, à medida que o tempo de jejum aumenta e há maior dificuldade de diagnóstico positivo, pela escassez de alimento residual.

Assim, o presente trabalho sugere que o método capilar pode ser o escolhido como de rotina, quando apenas o problema de diagnóstico é considerado, excluindo-se, por exemplo, considerações de custo. Todavia, se uma confirmação dos resultados se fizer necessária, aconselha-se que no novo projeto se trabalhe apenas com o *T. infestans*, com observações sendo feitas a partir de 60 dias de jejum, em intervalos de 15 dias, e com maior número de insetos em cada sessão.

3.2 — Mortalidade

A Fig. 1 mostra a mortalidade das duas espécies, através de curvas de sobrevivência. Deve-se lembrar que em cada sessão

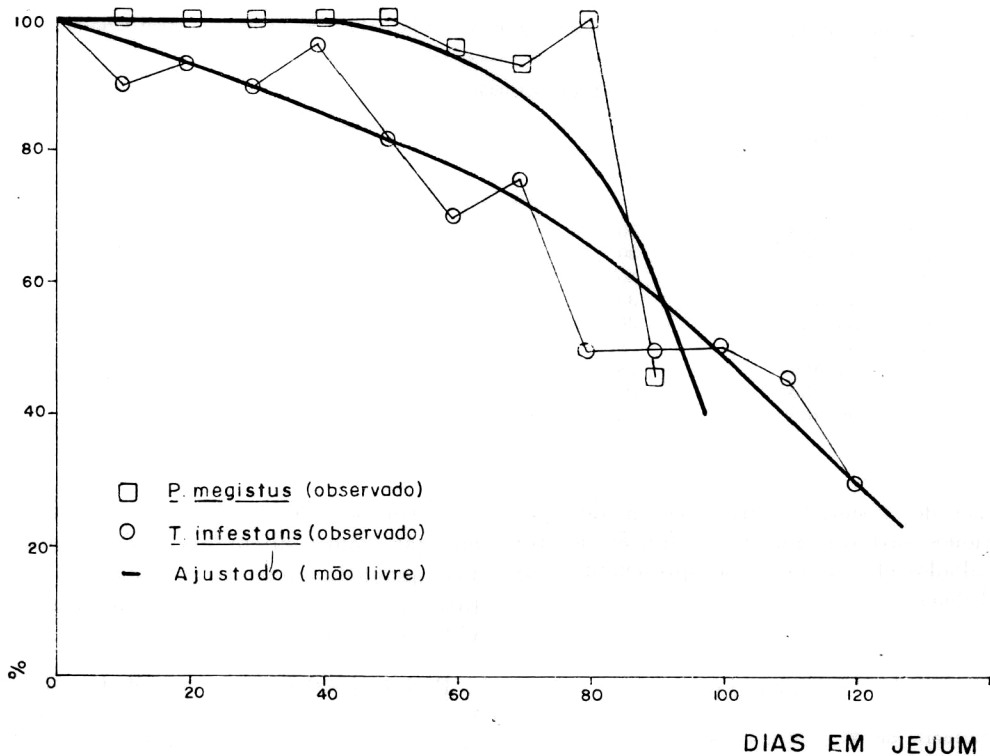


Fig. 1 — Sobrevivência dos triatomíneos, segundo dias em jejum.

o conjunto de insetos observados era independente do anterior, não se tendo, portanto, a curva clássica de sobrevivência (ou mortalidade) acumulada, que exigiria, em cada sessão, observação de todas as caixas de papelão, procedimento que se julgou inconveniente para a presente pesquisa. Assim, procedeu-se a uma correção, ajustando-se, à mão livre, curvas contínuas decrescentes de sobrevivência, aos dados observados.

Vê-se que a força da mortalidade para o *T. infestans* é razoavelmente constante durante todo o período de observação enquanto que, para o *P. megistus*, essa força de mortalidade é menor no começo do jejum, aumentando acentuadamente a cada sessão, a partir do 50.º dia (5.ª ses-

são), o que poderia estar indicando diferentes processos de metabolização do sangue.

4 — CONCLUSÕES

Os resultados do experimento sugerem que a técnica padrão a ser utilizada como rotina deva ser a dos tubos capilares. Quanto à mortalidade, parece que o *P. megistus* tem uma resistência inicial maior ao jejum, enquanto que para o *T. infestans*, a força de mortalidade mostrou-se constante.

AGRADECIMENTO

Ao Sr. Antenor N. Ferraz Filho, pela colaboração na parte de laboratório.

RSPU-B/291

ANDRADE, J. C. R. de et al. — [Comparison between two serological techniques used in the study of blood sucked by arthropods]. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 9:539-45, 1975.

SUMMARY: *The techniques of precipitin in capilar tubes and imunodifusion in agar jelly, for human blood sucked by arthropods were compared. 360 T. infestans and 270 P. megistus were observed, and the comparative mortality of both species was also studied. The results suggest that the capilar method is slightly better. As regards mortality, the resistance to fasting by the T. infestans was uniform during the whole period of observation, while for the P. megistus mortality was low until the 50th day of fasting, increasing markedly from then onwards.*

UNITERMS: *Serological techniques. Trypanosomiasis, South American. Triatomids.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CORREA, R. R. & AGUIAR, A. A. — O teste de precipitina na identificação da fonte alimentar do *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). *Arg. Hig. Saúde públ.*, 17:3-7, 1952.
 2. FREITAS, J. L. P. et al. — Investigações epidemiológicas sobre triatomíneos de hábitos domiciliares e silvestres, com o auxílio da reação de precipitina. *Rev. Inst. Med. trop.*, São Paulo, 2: 90-9, 1960.
 3. RICCIARDI, I. D. & MELLO, M. T. — Identificação de hábitos alimentares de artrópodes hematófagos, principalmente "barbeiros", por meio de provas de imunodifusão em gel de agar (Ouchterlony). *Rev. bras. Malar.*, 3: 595-601, 1969.
 4. SIQUEIRA, A. F. — Estudos sobre a reação de precipitina aplicada à identificação de sangue ingerido por triatomíneos. *Rev. Inst. Med. trop.*, S. Paulo, 2:41-53, 1960.
 5. WEITZ, B. — The identification of blood meals in blood sucking arthropods by the precipitin test. *Bull. Wild. Hlth. Org.*, 15:473-90, 1953.
- Recebido para publicação em 28/08/1975*
Aprovado para publicação em 22/09/1975