
ESTUDO COMPARATIVO ENTRE DUAS TÉCNICAS DE XENODIAGNÓSTICO ARTIFICIAL APLICADO EM PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS

Luciamáre P. A. Martins,¹ Roberto E. P. Castanho,² João Aristeu da Rosa,²
Maurício O. Tokumo,¹ Charles A. P. de Godoy¹ e Raphael de M. Rosa¹

RESUMO

Foram realizados 33 xenodiagnósticos artificiais em pacientes sabidamente chagásicos crônicos, em um estudo comparativo com duas técnicas diferentes; uma técnica proposta por Lima & Rey (1991) e outra por Silva (1991). Nesse estudo utilizaram-se ninfas de terceiro estágio de *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius neglectus* e *Triatoma infestans*. Dos 33 xenodiagnósticos realizados, seis foram positivos, sendo dois (6,1%) pela primeira e quatro (12,1%) pela segunda. A faixa etária acima de 55 anos foi a que apresentou maior número de casos positivos. Ao comparar o volume de sangue ingerido, observou-se que os triatomíneos sugaram maior quantidade quando foi utilizada a técnica de Silva (1991) com ($p < 0,0001$), sendo que a espécie que ingeriu maior volume foi o *P. megistus*.

UNITERMOS: *Trypanosoma cruzi*. *Panstrongylus megistus*. *Triatoma infestans*. *Rhodnius neglectus*. Xenodiagnóstico artificial.

INTRODUÇÃO

O xenodiagnóstico artificial foi idealizado em 1947 por Romaña & Gil, devido a algumas desvantagens apresentadas na realização do xenodiagnóstico natural, como por exemplo o aparecimento de reações alérgicas em alguns pacientes quando picados por triatomíneos do gênero *Rhodnius*. Relata-se também a possibilidade de transmissão por esses insetos de algumas infecções, como viroses, e o método artificial torna-se a melhor opção, principalmente em pacientes imunodeprimidos (1).

Com o intuito de melhorar a sensibilidade desse exame, várias pesquisas têm sido realizadas. Diferentes tipos de membranas foram testadas, como a pele de cobaio, pomba, fragmentos de intestino de boi, papel

1 Faculdade de Medicina de Marília

2 Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara.

Endereço para correspondência: E-mail autor: luciapam@famema.br

Recebido para publicação em 4/4/2001. Revisto em 3/7/2001. Aceito em 4/7/2001.

parafinado, látex (1, 2, 5, 15), para verificar a facilidade da alimentação dos triatomíneos, como também foi estudada a influência dos anticoagulantes, como heparina, EDTA, citrato de sódio a 3,8% (1,2,4,20) na sobrevivência dos barbeiros, visto que alguns anticoagulantes podem interferir na sobrevivência desses insetos.

Na busca por um inseto ideal para ser utilizado no xenodiagnóstico, muitos autores testaram a susceptibilidade de várias espécies de triatomíneos, tanto na doença de Chagas na fase aguda quanto na crônica (6, 7, 12, 17). Da mesma forma, técnicas com procedimentos diferentes têm sido utilizadas, como a proposta por Lima & Rey (1991), em que os triatomíneos são colocados em estufa a 37° C juntamente com o sangue para serem alimentados, e a proposta por Silva (1991), em que os triatomíneos permanecem à temperatura ambiente, e somente o sangue a ser oferecido é aquecido a 37° C.

Com a finalidade de comparar a eficácia do xenodiagnóstico artificial, visando facilitar sua realização na rotina laboratorial da doença de Chagas crônica, realizou-se este estudo, utilizando duas diferentes técnicas e três espécies de Triatominae.

MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes

Os 33 indivíduos estudados eram pacientes chagásicos crônicos do Serviço de Cardiologia e Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Marília. O estudo foi iniciado após aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Marília, e assinado por participantes que concordaram em participar do estudo.

Xenodiagnóstico

Utilizaram-se duas técnicas de xenodiagnóstico artificial. Uma é a proposta por Lima & Rey (1991), em que o sangue a ser oferecido aos triatomíneos é colocado em um preservativo de látex não-lubrificado e previamente lavado. Este preservativo é então amarrado na extremidade e preso na borda do frasco, contendo os triatomíneos, por uma fita adesiva. Esse conjunto (frasco dos triatomíneos mais preservativo com sangue) é então levado para a estufa a 37° C, por uma hora, para a alimentação.

A outra técnica utilizada é a proposta por Silva (1991), em que o sangue é mantido aquecido por um banho que circula água a 37° C, por um circuito de mangueiras, que penetra em um recipiente de vidro contendo duas câmaras: uma câmara externa que serve para circular a água aquecida e uma câmara interna onde o sangue é colocado. Este recipiente de vidro é vedado

por um preservativo de látex sem lubrificante. Nessa técnica os triatomíneos permanecem a temperatura ambiente para serem alimentados. Em cada técnica de xenodiagnóstico foram utilizados nove ml de sangue venoso, tendo o citrato de sódio a 3,8% como anticoagulante. Os testes foram realizados simultaneamente.

Triatomíneos

Foram utilizadas 10 ninfas de terceiro estágio de cada uma das seguintes espécies: *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius neglectus* e *Triatoma infestans*, sendo 30 triatomíneos para cada técnica de xenodiagnóstico realizado com um total de 60 insetos por paciente.

Pesagem dos triatomíneos

Foram pesados lotes de 10 triatomíneos segundo a espécie, antes e após a realização dos xenodiagnósticos, em balança analítica, com o propósito de se avaliar a ingestão sanguínea em cada técnica de xenodiagnóstico utilizada.

Leitura dos xenodiagnósticos

A leitura dos xenodiagnósticos foi realizada em *pool* por espécie de triatomíneo no 30º dia após a realização desses exames, pela técnica da compressão abdominal por meio de pinças (3), utilizando solução salina a 0,6% como diluente(18).

Análise estatística

Utilizaram-se os testes de Mann-Whitney e o de Kruskal-Wallis, para a análise de associação entre as variáveis.

RESULTADOS

Dos 33 indivíduos estudados, 20 (60,6%) eram do sexo feminino e 13 (39,34%) do sexo masculino. A faixa etária variou de 24 a 71 anos, com média de 54,5 anos ($\pm 10,7$), sendo 15 (45,45%) abaixo de 55 anos e 18 (54,55%) acima de 55 anos (Tabela 1).

Desses 33 xenodiagnósticos realizados, seis foram positivos, sendo dois (6,06%) pela técnica de Lima & Rey (1991) e quatro (12,12%) pela técnica de Silva (1991). Nenhum paciente mostrou-se positivo concomitantemente pelas duas técnicas.

Dos quatro xenodiagnósticos positivos, pela técnica de Silva (1991), o *T. infestans* mostrou-se positivo em dois, o *P. megistus*, em um e o *R. neglectus*, também em um. Dos dois xenodiagnósticos positivos pela técnica de Lima & Rey (1991), um foi positivo pelo *R. neglectus*, e o outro mostrou-se positivo tanto pelo *R. neglectus* como pelo *P. megistus*.

Tabela 1. Resultados de xenodiagnóstico pelas duas técnicas

Nome	Idade	Sexo	LIMA & REY	SILVA
AMJB	57	F	N	N
GSL	58	M	N	N
PR	71	M	N	P (<i>T. infestans</i>)
IOB	65	F	N	N
COS	51	F	N	N
FRB	59	F	N	N
OJT	50	M	N	N
MD	68	F	N	N
SP	60	M	N	N
JSS	52	M	N	N
JJ	57	M	P (<i>P. megistus</i> e <i>R. neglectus</i>)	N
MPC	55	F	N	N
MFC	69	F	N	N
EPS	45	M	N	N
JM	36	M	N	N
DMJ	35	F	N	N
ABS	54	M	N	N
GSP	47	F	N	N
HSP	64	F	N	N
TVC	40	F	N	N
TCO	54	F	N	N
JM	51	M	N	N
CFS	44	M	N	N
EISP	56	F	N	N
MNMS	53	F	N	N
ERR	24	M	N	N
OPF	48	F	N	N
NHS	59	F	N	N
RNS	63	F	N	P (<i>T. infestans</i>)
ACB	58	F	N	P (<i>R. neglectus</i>)
JFB	70	M	N	N
MAV	60	F	P (<i>R. neglectus</i>)	N
MJIB	65	F	N	P (<i>P. megistus</i>)

Observou-se que os triatomíneos do gênero *Panstrongylus* ingeriram maior quantidade de sangue em relação aos triatomíneos do gênero *Rhodnius* e *Triatoma* com $p < 0,001$ e $p < 0,01$ (Kruskal- Wallis), respectivamente, pela técnica de Lima & Rey (1991). Um fato semelhante foi observado pela técnica de Silva (1991), em que a ingestão de sangue foi maior nos

triatomíneos do gênero *Panstrongylus* em relação aos triatomíneos do gênero *Rhodnius* e *Triatoma* com $p < 0,01$ e $p < 0,05$. Entre os gêneros *Triatoma* e *Rhodnius*, obteve-se uma diferença estatisticamente não significativa ($p > 0,05$), tanto pela técnica de Lima & Rey (1991) como pela técnica de Silva (1991) (Tabela 1).

Comparando a quantidade de sangue ingerida pelas ninfas de triatomíneo das três espécies utilizadas em cada técnica realizada, observou-se que a alimentação sanguínea dos triatomíneos foi maior pela técnica de Silva (1991), considerada estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) pelo teste de Mann-Whitney.

A mediana da quantidade em gramas de sangue ingerido com os respectivos valores de p está expressa na Tabela 2.

Com relação à faixa etária, os seis xenodiagnósticos positivos foram encontrados nos pacientes acima de 55 anos, e nenhum nos pacientes abaixo de 55 anos.

Tabela 2. Mediana da quantidade em gramas de sangue ingerido, segundo espécie de triatomíneo e técnica de xenodiagnóstico

Espécie de triatomíneo	Técnica de Lima & Rey	Técnica de Silva
<i>T. infestans</i>	0,0667 ¹	0,2684 ²
<i>R. neglectus</i>	0,0343 ³	0,3399 ⁴
<i>P. megistus</i>	0,1485 ⁵	0,4472 ⁶

Teste de Mann-Whitney: (1-2) (3-4) (5-6): $p < 0,0001$

Teste de Kruskal-Wallis: (5-3): $p < 0,001$
 (5-2): $p < 0,001$
 (6-4): $p < 0,001$
 (6-2): $p < 0,005$
 (1-3) (2-4): $p > 0,05$

DISCUSSÃO

Desde sua idealização, o xenodiagnóstico artificial tem sido objeto de estudo de vários pesquisadores, com o intuito de aprimorar a técnica, melhorar sua sensibilidade e torná-la de fácil aplicação na rotina laboratorial para a pesquisa parasitológica do *Trypanosoma cruzi*.

Assim, Cedillos et al. (1982) realizaram vários xenodiagnósticos artificiais, expondo-os a diferentes temperaturas, e concluíram que, quando os triatomíneos eram colocados em estufa a 37°C, havia maior excitabilidade dos insetos, dificultando a alimentação. Os resultados encontrados neste trabalho concordam com os dos autores acima, em que as três espécies de triatomíneos alimentadas pela técnica de Lima & Rey (1991) ingeriram uma

quantidade de sangue menor do que quando alimentadas pela técnica de Silva (1991) com $p < 0,0001$.

Segundo Pereira et al. (1995) e Pietrokovsky et al. (1996), a ingestão de uma quantidade maior de sangue facilitaria a infecção dos triatomíneos pelo *T. cruzi*, enquanto, para Silva & Salha (1994), essa quantidade de sangue não é fator determinante na infecção pelo protozoário. Analisando os nossos resultados obtidos, pode-se observar que dos 33 xenodiagnósticos realizados, quatro foram positivos pela técnica de Silva (1991), e dois pela técnica de Lima & Rey (1991). Esses resultados mostram, a nosso ver, uma maior sensibilidade do xenodiagnóstico, quando utilizada a técnica de Silva (1991). Embora a diferença de susceptibilidade entre as espécies de triatomíneos não possa ser analisada mais detalhadamente devido ao baixo número de xenodiagnósticos positivos, esses resultados estão mais de acordo com os relatos de Pereira et al. (1995) e Pietrokovsky et al. (1996).

Nesse aspecto, pode-se fazer uma análise intra e interespecífica quanto à quantidade de sangue ingerida, pois não se pode relegar a questão da susceptibilidade de cada espécie de triatomíneo, em que a quantidade de sangue ingerida pode não ser fator determinante na infecção pelo *T. cruzi*.

A positividade baixa encontrada nesses xenodiagnósticos pode estar relacionada ao método de coleta das fezes dos triatomíneos e ao tempo de leitura pós-infecção. Silva et al. (1993) referem que a técnica das dejeções espontâneas é mais eficiente que a compressão abdominal na leitura dos xenodiagnósticos. Optou-se pela técnica da compressão abdominal, pela maior praticidade e exequibilidade. Da mesma forma, como relatado, o tempo de leitura também pode ter alguma influência. Schenone et al. (1974) propõem a leitura no 30º dia pós-infecção, porém Santos et al. (1995) aumentaram significativamente a positividade dos xenodiagnósticos, repetindo-se as leituras no 60º dia pós-infecção.

Percebeu-se que os exames realizados nas faixas etárias mais elevadas dão uma porcentagem maior de positividade, fato aliás observado por Santos et al. (1995). Nesse aspecto, observamos, nos pacientes com idade acima de 55 anos, uma positividade de 33,33%, enquanto nenhum xenodiagnóstico foi positivo na faixa etária abaixo de 55 anos.

Com relação à faixa etária, algumas observações devem ser colocadas. Se a casuística fosse composta somente pelos pacientes da faixa etária acima de 55 anos, comum em áreas não mais endêmicas, ter-se-ia obtido um resultado mais favorável, levando-se em consideração a realização de duas técnicas em que houve a somatória dos resultados.

Com base nesses resultados, podemos inferir que, pela maior quantidade de sangue ingerida pelos barbeiros, a técnica de Silva (1991) é mais adequada.

SUMMARY

Comparative study on two artificial xenodiagnosis techniques in chronic chagasic patients

Thirty-three artificial xenodiagnosis were carried out in patients with chronic Chagas disease with two different techniques. One technique was proposed by Lima & Rey (1991) and the other by Silva (1991). In this study 3rd instar *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius neglectus* and *Triatoma infestans* nymphs were used. Six cases were positive, 2 (6,06%) by Lima & Rey (1991) technique and 4 (12,12%) by Silva (1991) technique. The age group above 55 years was the one that presented a larger number of positive cases. When Silva (1991) technique was used bugs sucked a larger amount of blood. *P. megistus* was the species that ingested a larger amount of blood.

KEYWORDS: *Trypanosoma cruzi*. *Panstrongylus megistus*. *Triatoma infestans*. *Rhodnius neglectus*. Artificial xenodiagnosis.

REFERÊNCIAS

1. Campos R, Amato Neto V, Matsubara L, Bailloti AA, Pinto PLS. Estudo sobre o xenodiagnóstico "in vitro". Escolha de anticoagulante e de membrana. *Revista do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo*, 43:101-103, 1988.
2. Cedillos RA, Torrealba JW, Tonn RJ, Mosca W, Ortegón A. EL xenodiagnóstico artificial em la enfermedad de Chagas. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, 93: 240-249, 1982.
3. Cerisola JA, Rohwedder R, Segura EL, Del Prado CE, Alvarez M, Martini GJW. El xenodiagnóstico. Secretaria de Estado de la Salud Pública, 1974.
4. Isac E. Influência da heparina e do citrato de sódio no xenodiagnóstico artificial. *Rev Pat Trop* 23:121-143, 1994.
5. Nussenzweig V, Sonntag R. Xenodiagnóstico artificial. Novo processo. Primeiros resultados positivos. *Revista Paulista de Medicina* 40:69-71, 1952.
6. Perlowagora-Szumlewicz A, Muller CA. Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas' disease. 1- Comparative xenodiagnosis with nine triatomine species of animals with acute infections by *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 77:37-53, 1982.
7. Perlowagora-Szumlewicz A, Muller CA. Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas' disease. 2- Attempts to upgrade the reliability and efficacy of xenodiagnosis in chronic Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 82:259-272, 1987.
8. Pereira JB, Zauza PL, Junqueira ACV, Ferreira MC. Xenodiagnóstico na doença de Chagas crônica: a positividade das ninfas e a quantidade de sangue ingerido. Resultados preliminares. *Rev Soc Bras Med Trop* 28(supl):112, 1995.
9. Pietrokovsky S, Bottazzi V, Schweignam N, Haedo A, Wisnivesky-Colli C. Comparison of the blood meal size among *Triatoma infestans*, *T. guasayana* and *T. sordida* (Hemiptera: Reduviidae) of Argentina under laboratory conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91:241-242, 1996.

10. Rey L. Parasitologia: Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nas Américas e na África. 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. Cap. 63, p. 681-93: Métodos e Técnicas Usuais em Parasitologia.
11. Romaña C, Gil J. Xenodiagnóstico artificial. *Annaes do Instituto Medico Regional de Tucuman* 2:57-60, 1947.
12. Santos AH, Silva IG, Batista JD. Susceptibilidade da cepa "Y" de *Trypanosoma cruzi* em diferentes espécies de triatomíneos. *Revista Goiana de Medicina* 39:17-22, 1993.
13. Santos AH, Silva IG, Rassi A. Estudo comparativo entre o xenodiagnóstico natural e o artificial em chagásicos crônicos. *Rev Soc Bras de Med Trop* 28:367-373, 1995.
14. Schenone H, Alfaro E, Rojas A. Bases y rendimiento del xenodiagnosis en la infeccion chagásica humana. *Boletin Chileno de Parasitologia* 29:24-26, 1974.
15. Silva II. Sobre la conveniencia de realizar el xenodiagnóstico fuera del organismo humano en todos los casos. *Revista de la Facultad de Medicina de Tucuman* 1:405-415, 1958.
16. Silva IG. Dispositivo para realização do xenodiagnóstico artificial. *Rev Pat Trop* 20:35-38, 1991.
17. Silva IG, Silva HHG. Suscetibilidade de 11 espécies de triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae) à cepa "Y" de *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). *Revista Brasileira de Entomologia* 37:459-463, 1993.
18. Silva IG, Luquetti AO, Silva HHG. Importância do método de obtenção das dejeções dos triatomíneos na avaliação da susceptibilidade triatomínica para *Trypanosoma cruzi*. *Rev Soc Bras Med Trop* 26:19-24, 1993.
19. Silva IG, Salha LA. Aspectos da susceptibilidade dos triatomíneos ao *Trypanosoma cruzi* na busca de um modelo experimental. *Rev Pat Trop* 23:93-100, 1994.
20. Souza HBWT, Moreira AAB, Matsubara L, Campos R, Amato Neto V, Pinto LS, Takiguti CK. Estudo sobre o xenodiagnóstico "in vitro". Comparação com o xenodiagnóstico "in vivo". *Revista do Hospital de Clinicas da Faculdade de Medicina de São Paulo* 43:165-167, 1988.