

Correlação entre a positividade do xenodiagnóstico artificial e a quantidade de sangue e triatomíneos utilizados no exame, em pacientes chagásicos crônicos

Correlation among the positivity of the artificial xenodiagnosis and the amount of blood and triatomines used in the exam, in chronic chagasic patients

Yara Bandeira Azevedo Franco¹, Ionizete Garcia da Silva¹, Anis Rassi², Alessandra Carla Rodrigues Galvão Rocha¹, Heloisa Helena Garcia da Silva¹ e Gustavo Gabriel Rassi³

Resumo Estudou-se a correlação entre a positividade do xenodiagnóstico artificial e a quantidade utilizada de sangue e de triatomíneos, em 200 pacientes na fase crônica da doença de Chagas. Colheram-se 10 ou 40ml de sangue através de tubos a vácuo, heparinizados com 20,4UI, sendo realizado com 60 e 360 triatomíneos, respectivamente. Usou-se *Dipetalogaster maximus*, *Triatoma infestans*, *Triatoma vitticeps* e *Rhodnius neglectus*, nos estádios 1^o, 3^o, 3^o e 4^o, respectivamente. A coproscopia dos triatomíneos foi realizada aos 30 e 60 dias após a aplicação. A positividade do xenodiagnóstico com o primeiro e o segundo métodos foi de 19% e 44%, respectivamente, sendo altamente significativa a correlação entre a quantidade utilizada de sangue e triatomíneos e a positividade ($p < 0,01$). A xenopositividade nas faixas etárias variou de 9,7 a 100%, sendo maior em jovens e adultos até 34 anos, e independente em relação ao sexo dos pacientes.

Palavras-chaves: Xenodiagnóstico artificial. Doença de Chagas. Fase crônica.

Abstract The aim of this study was to verify whether the amount of blood and number of triatomines used could improve the artificial xenodiagnosis performed in 200 chronic phase infected individuals. Ten or 40ml of peripheral blood was collected in heparinized (20.4 IU) vacuum tubes, and fed to 60 and 360 triatomines, respectively. *Dipetalogaster maximus* (1st instar, about 15 days after eclosion), as well as 3rd instar *Triatoma infestans* and *Triatoma vitticeps* and the 4th instar of *Rhodnius neglectus* were used. The faecal examinations were performed 30 and 60 days after xenodiagnosis procedure. The positivity with 10ml of blood was 19% and with 40ml, 44%, from which it was concluded that a correlation existed between the amount of blood and the number of triatomines used ($p < 0.01$). The positivity of the xenodiagnosis ranged from 9.7 to 100%, higher in young and adults up to 34 years old, but independent in relation to the sex of the chronic chagasic individuals studied.

Key-words: Artificial xenodiagnosis. Chagas' disease. Chronic phase.

Após ter sido demonstrada a viabilidade do uso do xenodiagnóstico artificial em rotina de laboratório^{9 15 16} para pacientes chagásicos crônicos, a sua utilização foi ampliada^{1 7 8}. Em Goiás, onde a prevalência da doença de Chagas na fase crônica é alta, o xenodiagnóstico artificial faz parte da rotina diária de laboratório. A utilização desse método constitui avanço em relação ao método natural, com melhora da condição psicológica e maior adesão dos pacientes aos protocolos experimentais.

Mesmo existindo várias técnicas disponíveis para o diagnóstico da doença de Chagas, o xenodiagnóstico continua sendo útil, especialmente em ensaios clínicos, na seleção e acompanhamento de pacientes e verificação da eficácia de fármacos tripanosomicidas.

Este trabalho teve como objetivo analisar a possível correlação entre a positividade do xenodiagnóstico artificial, a quantidade de sangue e triatomíneos e a idade dos pacientes, visando esclarecer a sua sensibilidade, diminuir sua limitação de uso e orientar a sua aplicação clínica.

1. Laboratório de Biologia e Fisiologia de Insetos e Xenodiagnóstico do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (UFG); 2. Hospital São Salvador, Goiânia, GO, Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás; 3. Laboratório Atalaia, Goiânia, GO.

Apoio financeiro: FUNAPE/UFG

Endereço para correspondência: Prof. Ionizete Garcia da Silva. Laboratório de Biologia e Fisiologia de Insetos e Xenodiagnóstico/IPTSP/UFG, Caixa Postal 131, 74001-970 Goiânia, GO

Fax: 55 62 261-2675

e-mail: ionizete@iptsp.ufg.br

Recebido para publicação em 23/10/2001.

MATERIAL E MÉTODOS

Triatomíneos. Utilizaram-se ninfas de *Dipetalogaster maximus*, *Rhodnius neglectus*, *Triatoma infestans* e *T. vitticeps*, criadas de acordo com a metodologia definida para cada espécie^{11 17 18 19}.

No xenodiagnóstico artificial, utilizando 10ml de sangue, foram aplicadas 60 ninfas de *D. maximus*, no 1º estágio, 15 dias após a eclosão. No exame utilizando 40ml de sangue, usaram-se 90 ninfas de cada uma das espécies, sendo as de *D. maximus*, no 1º estágio, as de *T. infestans* e de *T. vitticeps* no 3º e as de *R. neglectus* no 4º estágio, totalizando 360 triatomíneos para cada xenodiagnóstico.

Pacientes e aspectos éticos. Foram avaliados 200 pacientes chagásicos crônicos não tratados especificamente, previamente diagnosticados por exame sorológico (IFI, HAI e ELISA), com acompanhamento médico no Hospital São Salvador e no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás. Formaram-se dois grupos de 100 pacientes, que tiveram conhecimento prévio do estudo, e após anuência de cada paciente, colhiam-se 10ml de sangue no primeiro grupo, e 40ml no segundo. Os tubos com sangue foram codificados e enviados para exame laboratorial.

O sangue era coletado no antebraço, por punção na veia cubital, usando tubos a vácuo de 10ml, heparinizados com 20,4UI. No laboratório, o sangue era colocado no aparelho de *xeno* artificial¹² para alimentação das ninfas.

A coproscopia dos triatomíneos foi realizada aos 30 e 60 dias, utilizando-se o método das dejeções espontâneas¹⁴. Os insetos eram retirados dos frascos plásticos⁹ e transferidos para tubos de polietileno¹⁰ transparentes, que permitem melhor observação da alimentação. Colocavam-se quatro triatomíneos em cada frasco, devidamente identificados e numerados. Os insetos eram alimentados em galinha¹⁰ por um período de 20 minutos. Imediatamente após as dejeções, colhia-se uma amostra de fezes e urina de cada frasco, com um micropipetador de 50µl, transferindo-a para uma microplaca de fundo plano e examinando-a ao microscópio de inversão (400x).

Análise estatística. Empregou-se o teste do qui-quadrado, ao nível de significância de 5%, para comparação da positividade do xenodiagnóstico artificial, com o sexo e as faixas etárias dos pacientes. Usou-se o teste entre duas proporções, ao nível de 1%, para comparar a correlação da positividade entre o *xeno* realizado com 10 e 40ml de sangue.

RESULTADOS

A correlação da *xenopositividade* entre os dois grupos de chagásicos crônicos, utilizando os dois métodos de análise, foi altamente significativa, com $p < 0,01$ (Tabela 1 e Figura 1).

Utilizando-se 10ml de sangue e 60 ninfas de *D. maximus*, a *xenopositividade* foi significativamente maior (42,9%) nas faixas etárias de 24-34 anos e acima (33,3%) de 68 anos (Tabela 2, Figura 1). A

Tabela 1 - Positividade do xenodiagnóstico artificial realizado por dois métodos, em 200 pacientes chagásicos crônicos, de acordo com o sexo.

Sexo	10ml de sangue e 60 ninfas		40ml de sangue e 360 ninfas	
	NP/NE	%	NP/NE	%
Masculino	9/47	19,1	23/55	41,8
Feminino	10/53	18,9	21/45	46,7
Total	19/100	19,0	44/100	44,0

NP- Número de pacientes positivos
NE- Número de pacientes examinados

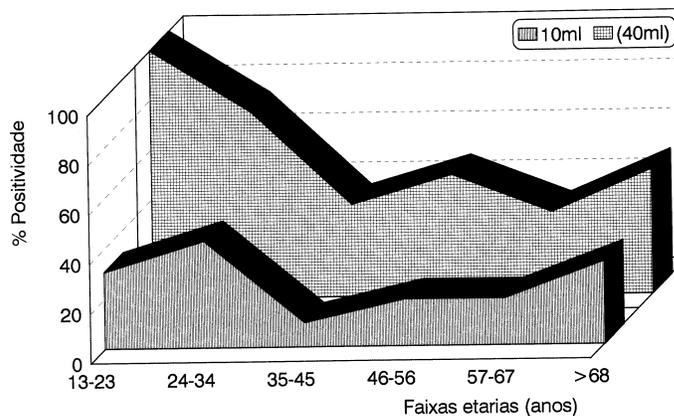


Figura 1 - Frequência da positividade do xenodiagnóstico artificial em chagásicos crônicos, realizado com 10ml e 90 ninfas, e 40 ml de sangue 360 ninfas.

Tabela 2 - Positividade do xenodiagnóstico artificial realizado com 10ml de sangue e 60 ninfas, em 100 pacientes chagásicos crônicos, de acordo com a faixa etária e o sexo.

Faixa etária	Masculino		Feminino		Total	
	NP/NE	%	NP/NE	%	NP/NE	%
13 – 23	1/7	14,3	3/6	50,0	4/13	30,8
24 – 34	0/2	0,0	3/5	60,0	3/7	42,9
35 – 45	3/18	17,7	0/13	0,0	3/31	9,7
46 – 56	2/11	18,2	1/13	7,7	3/24	18,8
57 – 67	2/7	28,6	1/9	11,1	3/16	18,8
> 68	1/2	50,0	2/7	28,6	3/9	33,3

NP- Número de pacientes positivos
NE- Número de pacientes examinados

xenopositividade do exame realizado com 40ml de sangue e 360 ninfas foi significativamente maior nas faixas etárias de 13-23 e 24-34 anos, com positividade de 100 e 75%, respectivamente (Tabela 3, Figura 1).

A faixa etária de 35-45 anos apresentou a mais baixa positividade do xenodiagnóstico, em ambos os

métodos (Figura 1). Na Tabela 2, observa-se que as faixas etárias de 35-45 e 57-67 tiveram *xenopositividade* estatisticamente iguais. Não houve diferença significativa na positividade do xenodiagnóstico entre pacientes chagásicos crônicos do sexo feminino e masculino (Tabela 1).

Tabela 3 - Positividade do xenodiagnóstico artificial realizado com 40 ml de sangue e 360 ninfas, em 100 pacientes chagásicos crônicos, de acordo com a faixa etária e o sexo.

Faixa etária	Masculino		Feminino		Total	
	NP/NE	%	NP/NE	%	NP/NE	%
13 – 23	1/1	100,0	0/0	0,0	1/1	100,0
24 – 34	2/3	66,7	1/1	100,0	3/4	75,0
35 – 45	9/23	39,1	5/13	38,0	13/38	34,2
46 – 56	8/18	44,4	9/17	52,9	17/35	48,6
57 – 67	2/9	22,2	4/9	44,4	6/18	33,3
> 68	1/1	100,0	2/5	40,0	3/6	50,0

NP- Número de pacientes positivos
NE- Número de pacientes examinados

DISCUSSÃO

Vários estudos foram realizados testando diferentes tipos de membranas^{2 4 6 13} para a alimentação artificial de triatomíneos. Isso sinalizava a possibilidade de adaptação do método para realizar o xenodiagnóstico artificial. Apesar desses trabalhos apontarem a tripa de boi como a membrana mais favorável à alimentação artificial, a sua utilização na rotina foi prejudicada devido sua baixa disponibilidade e dificuldades de preservação. O preservativo masculino, não lubrificado e sem espermicida, demonstrou viabilidade de uso tanto para criação de triatomíneos¹², quanto para a realização do xenodiagnóstico artificial^{1 8 9 15 16} e testes com anticoagulantes⁵. Além disso, os resultados obtidos na rotina, durante vários anos no laboratório, aliados à sua disponibilidade no comércio, facilidade de conservação e praticidade no uso, foram itens decisivos na opção pelo seu emprego.

Os resultados obtidos apontam para fatos de interesse, como o aumento da sensibilidade do xenodiagnóstico artificial com a elevação do número de triatomíneos e da quantidade de sangue colhido. Quando as ninfas foram aumentadas em seis vezes e em quatro a quantidade de sangue, a positividade

média do xenodiagnóstico elevou-se de 19 para 44%. Nas faixas etárias de baixa positividade, de 35 a 45 anos, o aumento da sensibilidade foi maior, pois a *xenopositividade* elevou-se de 9,7% para 37,1%, usando-se, respectivamente, 60 e 360 triatomíneos.

O xenodiagnóstico realizado com 40ml de sangue e 360 ninfas recebeu a denominação rotineira de *xenão*. Este apresentou maior sensibilidade para detecção do *Trypanosoma cruzi* e, dependendo da faixa etária, a sensibilidade aumentou em até quatro vezes, como na faixa etária mais difícil de se detectar o tripanosoma, a de 35 a 45 anos, confirmando a hipótese de que, aumentando-se a quantidade de triatomíneos e de sangue, eleva-se a possibilidade de se encontrar o tripanosoma circulante.

Nos dois grupos de 100 pacientes, a idade foi um fator determinante na positividade do xenodiagnóstico (Figura 1). A maior *xenopositividade* ocorreu na faixa etária de 24-34 anos com o primeiro método, sendo também elevada, nessa faixa etária, com emprego do segundo método, cumprindo ressaltar, neste caso, resultou ainda maior na faixa de 13-23 anos. Esses

resultados são concordantes com os da literatura^{3 4 8 9 15}, onde a faixa etária de 10-20 anos é a de maior positividade, decrescendo nas faixas etárias subseqüentes, e elevando-se nas faixas superiores a 50 anos. A freqüência da *xenopositividade* nas diversas faixas etárias pode ser atribuída ao tempo de infecção, à resposta imunológica associada à idade ou, ainda, à uma interação desses fatores.

A positividade do xenodiagnóstico artificial encontrada com as duas metodologias, foi independente em relação ao sexo dos pacientes, qualquer que fosse a faixa etária dos mesmos, observação concordante com outros trabalhos^{15 20} e discordante dos resultados⁹ obtidos com 56 pacientes chagásicos, no qual a positividade do xenodiagnóstico foi maior no sexo masculino.

A *xenopositividade* média de 44% parece ser um fato comum, pois outros pesquisadores^{3 4 7 20 21} encontraram índices similares. No entanto, deve ser ressaltado que 88% dos pacientes neste trabalho, encontravam-se nas faixas etárias de mais baixa parasitemia.

A correlação entre *xenopositividade* e a quantidade utilizada de triatomíneos e de sangue pode ampliar as

perspectivas de uso do xenodiagnóstico artificial na seleção de pacientes para tratamento específico e na verificação de efeitos terapêuticos, hipótese que está sendo testada nos pacientes *xenopositivos*, com o benzonidazol (trabalho em avaliação).

Além disso, existem outras vantagens no uso do xenodiagnóstico artificial em relação ao natural: 1) tempo reduzido de ocupação do paciente, cerca de quatro minutos para coleta de sangue, *versus* 30 minutos na aplicação do natural; 2) possibilidade de uso de maior número de espécies e de espécimes de triatomíneos; 3) possibilidade de realização à distância; 4) ausência de risco inerente ao transporte de triatomíneos; 5) ausência de incômodo das picadas e de reações alérgicas; 6) possibilidade de utilização em qualquer idade, sendo mais adequado para crianças, geralmente mais inquietas e menos tolerantes a procedimentos demorados; 7) adequação para pacientes imunodeprimidos ou transplantados; 8) não exposição do paciente à curiosidade de circunstâncias. Finalmente, quando é oferecida ao paciente a opção de escolha entre os métodos, essa recai, unanimemente, sobre o artificial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Azevedo YB, Rocha ACRG, Rassi A, Silva IG. Estudo comparativo entre a positividade do xenodiagnóstico artificial realizado com 10ml e 40ml de sangue. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 32(supl I): 326, 1999.
2. Campos R, Amato Neto V, Matsubara L, Moreira AAB, Pinto PLS. Estudos sobre o xenodiagnóstico "in vitro". I. Escolha de anticoagulantes e de membranas. Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo 43:101-103, 1988.
3. Castro CN, Alves MT, Macêdo VO. Importância da repetição do xenodiagnóstico para avaliação da parasitemia na fase crônica da doença de Chagas. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 16:98-103, 1983.
4. Cedillos RA, Torrealba JW, Tonn RJ, Mosca W, Ortegon A. El xenodiagnóstico artificial en la enfermedad de Chagas. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana 93:240-249, 1982.
5. Isac E. Influência da heparina e do citrato de sódio no xenodiagnóstico artificial. Revista de Patologia Tropical 23:121-143, 1994.
6. Nussenzweig V, Sontag R. Xenodiagnóstico artificial. Novo processo. Primeiros resultados positivos. Revista Paulista de Medicina 40:69-71, 1952.
7. Pineda JP, Luquetti A, Castro C. Comparação entre o xenodiagnóstico clássico e artificial na fase crônica da doença de Chagas. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 31:473-485, 1998.
8. Rocha ACRG, Azevedo YB, Silva APR, Rassi A, Silva IG. Aplicação do xenodiagnóstico artificial em chagásicos crônicos com a forma cardíaca, em estudo longitudinal. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 32(supl I):329, 1999.
9. Santos AH, Silva IG, Rassi A. Estudo comparativo entre o xenodiagnóstico natural e o artificial, em chagásicos crônicos. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 28:367-373, 1995.
10. Silva IG. Influência da temperatura na biologia de triatomíneos. I. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera, Reduviidae). Revista Goiana de Medicina 31:1-37, 1985.
11. Silva IG. Influência da temperatura na biologia de triatomíneos. XIII. *Dipetalogaster maximus* Uhler, 1894 (Hemiptera, Reduviidae). Anais da Sociedade Entomológica do Brasil 19:111-119, 1990.
12. Silva IG. Dispositivo para realização do xenodiagnóstico artificial. Revista de Patologia Tropical 20:35-38, 1991.
13. Silva IG, Luquetti AO, Silva HHG. Importância do método de obtenção das dejeções dos triatomíneos na avaliação da suscetibilidade triatomínica para *Trypanosoma cruzi*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 26:19-24, 1993.
14. Silva IG, Rassi A, Azevedo YB, Galvão AC. Aperfeiçoamento do xenodiagnóstico artificial na avaliação da parasitemia: correlação existente entre a quantidade de sangue usada no xenodiagnóstico e a positividade. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 30:84-85, 1997.
15. Silva IG, Santos AH, Rassi A. Viabilidade do xenodiagnóstico artificial para exames de rotina em laboratório em substituição ao método tradicional. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 27:97, 1994.
16. Silva IG, Silva HHG. Influência da temperatura na biologia de triatomíneos. II. *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 (Hemiptera, Reduviidae). Revista Goiana de Medicina 34:29-37, 1988.
17. Silva IG, Silva HHG. Influência da temperatura na biologia de triatomíneos. IV. *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera, Reduviidae). Anais da Sociedade Entomológica do Brasil 17:443-454, 1988b.
18. Silva IG, Silva HHG. Influência da temperatura na biologia de triatomíneos. X. *Triatoma vitticeps* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae). Revista Goiana de Medicina 34: 39-45, 1988c.

19. Silva IG, Silva HHG, Ostermayer AL, Rezende JM. Positividade do xenodiagnóstico de acordo com a faixa etária, sexo e forma clínica da doença de Chagas. *Revista de Patologia Tropical* 24:193-197, 1995.
20. Silva II. Sobre la conveniencia de realizar el xenodiagnostico fuera del organismo humano en todos los casos. *Revista de la Facultad Medicina de Tucumán* 1:405-415, 1958.
21. Souza HBWT, Moreira AAB, Matsubara L, Campos R, Amato Neto V, Pinto PLS, Takiguti CK. Estudo sobre o xeno "in vitro". II. Comparação do xeno "in vivo". *Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo* 43:165-167, 1988.