

Infecção experimental do *Culex quinquefasciatus* pelo *Plasmodium juxtannucleare* (*)

por

W. Lobato Paraense

(Divisão de Estudos de Endemias)

No decurso de estudos experimentais sobre o *Plasmodium juxtannucleare*, tive oportunidade de fazer numerosas tentativas de infecção de algumas espécies de mosquitos com este hematozoário.

Uma primeira série de experiências foi realizada em Manguinhos, durante os meses de fevereiro e março de 1942. Utilizei frangos de idade variável entre 1 e 6 meses, portadores de infecção experimental com a amostra 14-A, gentilmente cedida pelo meu amigo Dr. VALDEMAR VERSIANI, coautor da descrição do plasmódio referido.

A infecção das aves datava de 1 a 2 meses, e em todos os casos havia relativa abundância de formas sexuadas do parasito. Só foram utilizados animais em cujo sangue as contagens de gametócitos mostravam a presença de cerca de 10 elementos para 10.000 glóbulos vermelhos. Antes de serem as aves submetidas às picadas dos mosquitos, era feita a prova da exflagelação dos microgametócitos, segundo a técnica referida por JAMES (1931). Os resultados desta prova foram sempre negativos.

As aves nas condições descritas foram sugadas por pequenos lotes de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*. Os mosquitos desta última espécie pertenciam à colônia que há vários anos vem sendo mantida no laboratório. Quanto aos *Culex*, eram obtidos a partir de ovos provenientes de fêmeas capturadas em natureza.

Depois de se alimentarem nas aves infectadas, eram escolhidos os mosquitos que se achavam convenientemente repletos de sangue, os quais eram separados individualmente em tubos de Borrel deixados à temperatura do laboratório, em ambiente saturado de umidade. A partir daí eram alimentados exclusivamente com mel. Em condições idênticas eram colocados *A. aegypti* que haviam sugado sangue de aves infectadas com o *Plasmodium gallinaceum*.

Desde o 5.º até ao 20.º dia depois da alimentação sanguínea eram retiradas os estômagos e as glândulas salivares desses mosquitos para pes-

* Recebido para publicação a 8 de novembro e dado à publicidade em dezembro de 1944.

quisa de formas evolutivas do *P. juxtannucleare*. Foram assim examinados 152 exemplares de *C. quinquefasciatus* e 158 de *A. aegypti*, com resultados constantemente negativos. Por outro lado, os espécimes de *A. aegypti* alimentados com sangue parasitado pelo *P. gallinaceum* apresentaram sempre alto índice de infecção, ficando assim demonstrado que os insetos haviam sido colocados em condições ótimas para a evolução esporogônica dos parasitos.

Êstes resultados negativos foram comunicados verbalmente a VERSIANI, que a êles se referiu no seu trabalho publicado com a colaboração de FURTADO GOMES (1943).

Nova série de tentativas foi efetuada durante os meses de novembro de 1943 a fevereiro de 1944, em Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais. Examinando seis galinhas adquiridas no Mercado Municipal daquela cidade, provenientes de Japão de Oliveira (localidade situada na região oeste do Estado), encontrei uma delas intensamente parasitada pelo *P. juxtannucleare*. Esta ave morreu logo após a colheita do sangue para exame. Com sangue do coração foi imediatamente inoculada outra galinha adulta, por via intramuscular, aparecendo os primeiros parasitos na circulação depois de um período de incubação de 38 dias. As experiências atuais foram feitas com esta amostra por mim isolada.

Foram usados três frangos com 1 a 3 meses de idade, que apresentavam uma concentração de gametócitos em tórno de 10 elementos para 10.000 glóbulos vermelhos. Estas aves estavam infectadas há mais de um mês, a contar do aparecimento dos parasitos no sangue periférico. A prova da exflagelação dos microgametócitos foi sempre realizada antes da alimentação dos mosquitos, com resultados constantemente negativos.

Os insetos que sugavam até à repleção eram separados individualmente em tubos de Borrel e colocados em ambiente saturado de umidade, em câmara elétrica aquecida a 28-30° C. Daí em diante eram alimentados com mel.

Foram assim tratados 4 lotes de *C. quinquefasciatus* e um de *Aedes lepidus* (*). Os *Culex* foram obtidos de ovos depositados no laboratório por adultos capturados em natureza. Os *Aedes* faziam parte de uma colônia que manteve durante alguns meses a partir de focos encontrados na cidade de Belo Horizonte.

Resultados obtidos com *A. lepidus*. — Foram alimentados em ave infectada 15 mosquitos desta espécie, a 27-11-43. Do 6.º ao 20.º dia após a ingestão de sangue foram examinados os estômagos e as glândulas saliva-

(*) *Aedes (Ochlerotatus) lepidus*, n. sp., cuja descrição será oportunamente publicada em trabalho de N. Cerqueira e W. Lobato Paraense.

res. destes mosquitos, sendo examinado um exemplar em cada dia, com resultados negativos constantes.

Resultados obtidos com *C. quinquefasciatus*. — Foram alimentados 4 lotes em aves infectadas (ao todo 80 mosquitos), com os seguintes resultados:

Lote 1. Sugaram 18 exemplares, a 21-11-43. Examinados os estômagos e as glândulas salivares, com resultados negativos, do 8.º ao 22.º dia depois do repasto sanguíneo.

Lote 2. Sugaram 23 exemplares, a 23-11-43. Examinados os estômagos e as glândulas salivares, do 18.º ao 25.º dia após a alimentação sanguínea. Apenas um espécime, examinado no 23.º dia, continha alguns esporozoítas nas glândulas salivares. Os demais achavam-se negativos.

Lote 3. Sugaram 15 exemplares, a 16-1-44. Examinados os estômagos e as glândulas salivares, do 12.º ao 14.º dia após a refeição de sangue. Apenas um mosquito, examinado no 13.º dia, mostrava poucos esporozoítas na glândulas salivares. Os outros estavam negativos.

Lote 4. Sugaram 24 exemplares, a 23-1-44. Examinados os estômagos e as glândulas salivares, do 9.º ao 11.º dia depois da alimentação de sangue. Apenas o exemplar examinado no 9.º dia mostrou um oocisto maduro no estômago, repleto de esporozoítas, achando-se as glândulas salivares negativas. Os restantes estavam negativos.

Estes resultados acham-se tabulados no quadro n.º 1.

Afim de controlar as modificações ambientais em que permaneciam os mosquitos, foram colocados ao lado de cada lote, em idêntica situação, *A. lepidus* alimentados com sangue parasitado pelo *P. gallinaceum*. Este *Aedes*, conforme será relatado em trabalho a ser publicado, mostrara-se altamente sensível à infecção pelo *P. gallinaceum*, mantendo nestas experiências de controle, ainda uma vez, elevado índice oocístico e esporozoítico.

Como se verifica dos resultados desta segunda série de experiências, de 80 espécimes de *C. quinquefasciatus*, apenas 3 apresentaram infecção pelo *P. juxtannucleare*. Os mosquitos 33 e 53 mostraram esporozoítas nas glândulas salivares, respectivamente no 23º e no 13º dia depois de se alimentarem com sangue parasitado.

No primeiro caso os esporozoítas apareceram em número reduzido, acumulados em um ponto determinado de um lobo glandular, como se esti-

vessem reunidos em um pequeno cisto. Não existiam em outras regiões das glândulas e não foram encontrados nos canais excretores apesar de cuidadosamente procurados. Fazendo pressão lentamente sobre a lamínula assisti a rotura do lobo glandular ao nível do pseudo-cisto, passando os esporozoítas para o líquido fisiológico ambiente. O seu número não ia além de 15, e não apresentavam movimentos particulares. Depois de esmagadas as glândulas no líquido de exame, foi êste inoculado em um pinto, por via subcutânea. O material residual que ficou na lâmina foi corado pelo Giemsa, mostrando ao exame vários esporozoítas com estrutura típica. A ave inoculada foi observada durante 120 dias, não apresentando infecção.

No mosquito 53 o exame das glândulas salivares revelou a existência de esporozoítas em quantidade um pouco maior que no anterior. Apareceram parasitos dispersos por tãda a extensão dos lobos glandulares, e o material obtido por esmagamento dos tecidos em água fisiológica foi inoculado por via subcutânea em um pinto. Nas preparações coradas pelo Giemsa apareceram esporozoítas típicos e o animal inoculado, também neste caso, permaneceu negativo durante o período de observação de 120 dias.

O terceiro *Culex* positivo foi o de n.º 57, que fôra alimentado com sangue 9 dias antes. Mostrou um oocisto maduro na parede do estômago. Êste oocisto achava-se implantado em situação bem posterior, muito próximo à inserção dos tubos de Malpighi. Durante o exame observei a sua rotura sob a pressão da lamínula, dando saída a inúmeros esporozoítas. O líquido assim contaminado foi inoculado em um pinto, e no material residual corado foram recuperados vários elementos fusiformes típicos. A ave inoculada também permaneceu negativa durante 120 dias de observação.

De tudo quanto fica exposto, pode-se concluir com segurança que o *C. quinquefasciatus* é capaz de se infectar com o *P. juxtannucleare* em condições experimentais. Entretanto não parece que seja êle o transmissor habitual dêste plasmódio, dado o baixo índice de infectividade observado nestas experiências. Deve acontecer aqui fato semelhante ao que se passa com algumas espécies de anofelíneos em relação à malária aviária. Sabe-se que plasmódios aviários habitualmente transmitidos pelos culicíneos podem infectar anofelíneos em laboratório. Talvez se obtenha um índice mais elevado em condições mais favoráveis, ou seja alimentando os mosquitos com sangue portador de suficiente quantidade de microgametócitos capazes de exflagelação. Isto não foi possível nas minhas experiências, porque até hoje ainda não consegui evidenciar a formação de microgametas no *P. juxtannucleare*, apesar de repetidas tentativas em tãdas as épocas do ano. E' conhecida a relação existente entre o número de formas exflagelantes e o aparecimento da infecção no mosquito, pois a emissão de gametas é a prova mais convincente da maturidade sexual do microgametócito.

Já foi visto que os animais inoculados não se infectaram. A explicação dêste fracasso, relativamente aos que receberam esporozoítas das glândulas salivares, talvez se encontre na reduzida quantidade de parasitos inoculados. Os esporozoítas aderem fãcilmente à superfície das lâminas, o que concorre para diminuir ainda mais o número dos utilizãveis para inoculação.

Quanto ao animal inoculado com elementos provenientes do oocisto, recebeu uma carga parasitãria muito maior. A causa do não aparecimento da infecção neste caso é mais difícil de explicar, a menos que se admita que os esporozoítas só adquirem capacidade infectante depois de transitarem pelas glândulas salivares. Entretanto esta suposição não deve ser utilizada como argumento decisivo porque no momento atual ainda se aguarda a solução definitiva da pendência existente sôbre o assunto entre os pesquisadores. Foi possivel afastar, em todos os casos, a possibilidade de imunidade natural: transcorrido o praso de observação foram as aves inoculadas por via intravenosa com sangue parasitado, desenvolvendo-se em tôdas uma infecção típica.

QUADRO N.º 1

LOTE N.º.	CULEX N.º.	DIAS APÓS REPASTO SANGUÍNEO	RESULTADO		OBSERVAÇÕES
			Estômagos	Glândulas	
1	1-2	8	Negativo	Negativas	
	3	11	»	»	
	4-7	15	»	»	
	8-10	18	»	»	
	11-14	20	»	»	
	15-18	22	»	»	
2	19-22	18	Negativo	Negativas	Inoc. em pinto
	23-25	20	»	»	
	26-32	22	»	»	
	33	23	»	Positivas	
	34-39	23	»	Negativas	
	40-41	25	»	»	
3	42-46	12	Negativo	Negativas	Inoc. em pinto
	47-52	13	Negativo	»	
	53	13	Negativo	Positivas	
	54-56	14	Negativo	Negativas	
4	57	9	Positivo	Negativas	Inoc. em pinto
	58-73	10	Negativo	»	
	74-80	11	»	»	

SUMÁRIO

Foram feitas duas séries de experiências para verificar a possibilidade da infecção de mosquitos com o *P. juxtannucleare*.

Na primeira foram utilizados 158 exemplares de *Aedes aegypti* e 152 de *Culex quinquefasciatus*, com resultados negativos.

Na segunda série foram usados 15 espécimes de *Aedes lepidus*, com resultado negativo, e 80 de *C. quinquefasciatus*. Dêstes últimos apenas 3 se infectaram, não tendo sido possível transmitir a infecção a pintos inoculados. Este culicíneo não é considerado transmissor habitual do plasmódio em estudo, em vista do baixo índice de infectividade observado nas experiências.

São brevemente discutidos os resultados do presente trabalho, inclusive o insucesso das inoculações em pintos.

SUMMARY

In order to determine the possibility of infecting mosquitoes with *P. juxtannucleare* two series of experiments were made.

In the first series 158 *Aedes aegypti* and 152 *Culex quinquefasciatus* were examined with negative results.

In the second experiment 15 *Aedes lepidus* and 80 *C. quinquefasciatus* were used. All *Aedes lepidus* were negative. Three *Culex* were found to have become experimentally infected. However, no infection was produced in chickens which were inoculated with salivary glands or stomach removed from the three mosquitoes.

C. quinquefasciatus is not considered to be the common vector of *P. juxtannucleare* because of the very low infection index presented.

The results, including those of the unsuccessful chicken inoculations, are briefly discussed.

REFERÊNCIAS

JAMES, S. P.

1931. Some general results of a study of induced malaria in England. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 24 (5) : 477-538.

VERSIANI, V. & B. FURTADO GOMES

1943. "Plasmodium juxtannucleare", parasita da galinha doméstica (notas adicionais). *Rev. Brasil. Biolog.* 3 (1) : 113-117.