

SERVIÇO DE ESTUDO DAS GRANDES ENDEMIAS

Superintendente : Dr. E. Chagas

Criação de flebotomos e transmissão experimental da Leishmaniose visceral americana *

por

A. W. Chagas

(Com 5 estampas)

CRIAÇÃO DE F. INTERMEDIUS:

A criação de flebotomos para fins experimentais foi iniciada, nos laboratorios do Instituto Oswaldo Cruz, nos ultimos dias de Maio de 1938. Com o intuito de conseguir uma fonte constante de adultos, tanto para fins de criação como para experiencias de transmissão, foi colocada uma armadilha (fig. 1) em um galinheiro situado na encosta de uma colina coberta de mata densa no bairro das Laranjeiras (fig. 2), que passou a fornecer diariamente regular quantidade de insetos. Estes, transportados todas as manhãs aos laboratorios, eram separados por sexo, e as femeas divididas em dois grupos: as que se mostravam vazias de sangue e as que se achavam cheias. As femeas vazias eram utilizadas em experiencias de transmissão e as cheias colocadas em tubos de hemolize tampados com rolhas de algodão e forrados com papel de filtro humedecido (fig. 3), em numero de duas e três por tubo, para aguardar a desova. Os machos eram desprezados na sua maioria, mas um pequeno numero era colocado em uma gaiola onde se juntavam as femeas vazias que se recusassem a sugar.

Geralmente a desova das femeas trazidas cheias se processou ao 3.º dia, e a ela, na maioria dos casos, seguiu-se a morte do inséto.

A 30 de Maio, o papel de filtro que forrava um tubo de hemolize foi retirado com os ovos postos no dia anterior e colocado em placa de Petri (fig. 4) para aguardar a saída das larvas (fig. 5). Saídas estas a

* Recebido para publicação a 26 de Fevereiro de 1940 e dado á publicidade em Agosto de 1940.

5 de Junho, foram alimentadas com uma mistura a 10 : 1 de fezes de cobaia e sangue de coelho, ambos sêcos em estufa e pulverizados. As larvas (fig. n.º 6) alimentaram-se sempre perfeitamente e se desenvolveram normalmente, empupando (fig. 7) as primeiras a 2 de Julho. A 9 de Julho nasceu o primeiro adulto: um macho (fig. 8). A média de tempo de evolução de postura a adulto foi de 43 dias, distribuidos como segue: de postura à eclosão dos ovos, 7 a 9 dias; fase larvaria, 27 a 28 dias; fase pupal, 7 a 9 dias.

A criação foi levada excepcionalmente até a terceira geração, mas os ovos postos pelas fêmeas desta geração e a maioria dos ovos das fêmeas de segunda geração não ecluíram. A criação foi mantida até Junho de 1939, mas visto não haver animal infectado para continuação das experiências de transmissão, foi descontinuada. Damos abaixo a relação dos flebotomos capturados na armadilha e criados no laboratório de Junho de 1938 a Julho de 1939.

Quadro 1
Flebotomos

Mês	<i>I n t e r m e d i u s</i>				<i>L o n g i p a l p i s</i>	
	Capturados em armadilha		Criados no laboratório		Criados no laboratório	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Junho, 1938	1230	252				
Julho	392	97	79	82		
Agosto	1050	411	231	215		
Setembro	706	277	88	103	4	1
Outubro	185	42	731	803	0	0
Novembro	535	34	53 *	88 *	13	14
Dezembro	198	31	28	25	16	11
Janeiro, 1939	60	47	17	13	1	4
Fevereiro * *	2	2	39	56		
Março * *	76	20	169	195		
Abril * *	114	28	88	84		
Maió * *	189	21	26	29		
Junho * *	7	4	85	82		
Julho			39	35		
Agosto			2	7		
Total	4744	1266	1675	1817	34	30

* O aparelho de ar condicionado deixou de funcionar e esteve em concerto por cerca de 10 dias. Em consequencia, só algumas larvas nos estadios mais avançados sobreviveram.

* * Nestes mêses, por motivos alheios a nossa vontade, as capturas foram feitas com interrupções: em Fevereiro houve capturas apenas uma semana, em Março e Abril duas semanas e em Maio e Junho três semanas.

Todos os dias os flebotomos nascidos em laboratório durante as 24 horas precedentes eram liberados em gaiolas pequenas (fig. 9) for-

radas no fundo com panos que sempre eram mantidos molhados e contendo duas pequenas vasilhas, uma com algodão embebido em água e outra com algodão embebido em uma solução muito fraca de mel de abelha. Ao fim do primeiro dia eram retiradas as fêmeas, uma ou duas por tubo de hemolize, e no próprio tubo eram postas para se alimentar (fig. 10). Todas as que não se alimentavam eram soltas de novo na mesma gaiola onde diariamente eram liberados alguns machos capturados em natureza. Segunda tentativa de alimentação era feita no dia imediato, e no terceiro dia, si a fêmea continuasse a recusar alimento, era guardada separada em um tubo de hemolize até que se alimentasse ou morresse. Em um mês de experiências sómente três se alimentaram ao fim do primeiro dia, poucas no segundo dia, e a grande maioria no terceiro dia de vida adulta. Poucas fizeram uma segunda refeição antes de desovarem, e apenas uma desovou duas veses, tendo se alimentado pela terceira vês logo após a primeira desova. Esta se dava em tempo muito variavel depois da primeira refeição, de três a sete dias, sendo a média de cinco dias.

Nos meses de Junho e Julho, aproximadamente a metade das fêmeas de flebotomos, tanto as capturadas em natureza como as criadas em laboratorio, se alimentaram em cães infectados. No mês de Agosto houve uma redução consideravel no numero das que se alimentaram, e nos meses subsequentes, embora continuassemos usando a mesma tecnica empregada em Junho e Julho, a diminuição foi ainda maior. Tentamos então varias modificações na hora de alimentação, sem, comtudo, obter resultados favoraveis, como se vê no quadro abaixo:

Quadro 2
Alimentação de flebotomos

Mês	Fêmeas capturadas vazias	Fêmeas de criação	Total de fêmeas usadas	Fêmeas que se alimentaram	o/o de fêmeas que se alimentaram
Julho, 1938	48	82	130	66	50.8
Agosto	45	215	260	68	26.1
Setembro	67	103	170	22	12.9
Outubro	28	803	831	84	10.1
Novembro	14	88	102	14	13.7
Dezembro	16	25	41	6	14.6
Janeiro, 1939	13	13	26	5	19.2
Fevereiro	2	56	58	2	3.6
Março	7	195	202	13	6.4
Abril	18	84	102	16	15.7
Maió	17	29	46	11	24.0
Junho	1	82	83	11	14.2
Total	276	1775	2051	318	

Com o intuito de verificar qual a relação existente entre as condições de clima e a quantidade de flebotomos capturados, as temperaturas maxima e minima foram tomadas no local de capturas em Laranjeiras durante seis meses a começar pelo mês de Julho de 1938, com os seguintes resultados:

Quadro 3

Mês	N. de flebotomos capturados	Temperatura			
		Media		Absoluta	
		Mx.	Mn.	Mx.	Mn.
Julho 1938	489	20.4	15.5	24.0	13.0
Agosto	1461	22.6	17.0	28.0	15.0
Setembro	983	23.9	18.2	31.0	14.0
Outubro	227	24.0	19.1	27.0	16.0
Novembro	569	26.7	20.4	32.0	17.0
Dezembro	229	27.4	21.1	33.0	17.0

Constatou-se durante os meses de Julho a Setembro que a temperatura variava consideravelmente e que o registo diario da maxima e minima dava noção incompleta quanto às verdadeiras condições de temperatura. Foram, portanto, instalados aparelhos para um registo horario da humidade, pressão atmosferica e temperatura, como se vê no quadro 4.

Temendo o efeito do calor intenso do verão sobre a criação de flebotomos, foi instalado em Outubro um aparelho para conservar a temperatura da sala de criação sempre entre 22 e 24° C., com humidade acima de 80, visto que no fóco em Laranjeiras eram estas as condições. Em vista do numero reduzido de flebotomos criados no laboratorio, julgamos que a temperatura aí era ainda alta.

CRIAÇÃO DE *F. LONGIPALPIS*:

Tentamos tambem a criação de *F. longipalpis* com ovos postos por femeas capturadas em natureza e enviadas do Pará. Destes conseguimos 30 femeas, mas apenas oito se alimentaram uma vês, morrendo ao cabo de três a seis dias sem desovar. O método de criação empregado foi o mesmo usado para os *F. intermedius*, com uma excepção: as placas contendo larvas de *F. longipalpis* foram sempre conservadas na temperatura ambiente e não na sala refrigerada.

Quadro 4

Mês	Flebotomos capturados	Humidade			Pressão barométrica			Temperatura		
		Mn.	Media semanal	Mx.	Mn.	Media semanal	Mx.	Mn.	Media semanal	Mx.
1938										
Out. 12-16	84	72	82	86	558	762	768	20	21	23
17-23	13	73	86	95	754	760	766	23	22	24
24-30	34	64	88	100	755	760	762	19	23	25
31- 6	46	55	85	100	754	758	760	21	24	28
Nov. 7-13	54	63	90	100	750	758	760	18	23	29
14-20	88	65	90	100	752	756	761	20	23	31
21-27	230	48	75	100	750	758	762	21	24	30
28- 4	175	55	80	100	745	752	763	22	24	29
Dez. 5-11	53	57	90	100	747	755	759	18	23	26
12-18	41	58	88	100	750	753	758	20	25	29
19-25	39	73	94	100	749	752	758	23	24	27
26- 1	71	72	96	100	751	755	761	19	23	26
1939										
Jan. 2- 8	16	72	94	100	751	756	761	20	23	26
9-15	46	I N S T R U M E N T O S E M C O N C E R T O S								
16-22	28	52	85	99	751	754	758	21	26	32
23-28	16	55	83	98	746	752	756	22	25	30
30- 5	25	80	95	100	746	752	759	20	23	27
Fev. 6-12		54	81	96	754	756	759	21	25	30
13-19		55	87	100	753	756	758	22	24	31
20-26		55	81	98	753	757	759	23	26	31
27- 5	43	I N S T R U M E N T O S E M C O N C E R T O								
Mar. 6-12	8									
13-19	25									
20-26	23									
27- 2		Capturas suspensas			C O N C E R T O					
Abr. 3- 9										
10-16	15	81	93	100				22	24	26
17-23	49	34	94	100	757	759	761	18	19	22
24-30	78	76	95	100	752	755	758	20	22	24
Maio 1- 7	74	75	93	100	752	756	760	18	20	23
8-14	116	65	92	100	748	753	758	21	22	25
15-21		82	94	100	753	757	760	20	22	24
22-28	18	64	92	99	757	759	762	18	21	23
29- 4	7	80	85	100	754	756	761	19	21	22
Juu. 5-11	0	63	91	99	750	757	762	15	19	22
12-18	4	68	94	100	755	761	764	15	18	21
19-25	1	82	95	100	755	758	760	16	19	22

INFECÇÃO DE FLEBOTOMOS

Como se vê no quadro abaixo, durante onze meses foram alimentadas um total de 274 fêmeas de *Flebotomus intermedius* em cães infectados com *L. chagasi*. Destas, 231 fêmeas foram alimentadas em cães experimentalmente infectados e 43 em um cão naturalmente infectado. Das primeiras, 146 foram examinadas, não se apresentando nenhuma com leptomonas. Durante o mês de Outubro, embora tivéssemos muitos flebotomos adultos, não foi possível utilizá-los, por falta de cão infectado, visto ter morrido o último em meados de Setembro.

Em princípios de Novembro, porém, foi trazido de Piratuba, Pará, um cão encontrado infectado em natureza (Cão « Não te importes »), e retomamos as experiências. Das 20 fêmeas de *F. intermedius* que se alimentaram durante Novembro e Dezembro, três apresentaram flagelados com forma de leptomonas, uma no 6.º e duas no 3.º dia depois da refeição. Das 23 que se alimentaram de Janeiro a Abril, oito se infectaram.

Dos adultos *longipalpis*, conseguimos que 8 fêmeas se alimentassem no cão « Não te importes ». Examinadas 3 1/2 a 6 dias após a refeição, seis se apresentavam com flagelados com forma de leptomonas no tubo digestivo.

Quadro 5

Infecção de flebotomos

Mês	<i>Intermedius</i>			<i>Longipalpis</i>		
	Alimentados	Examinados	Posit.	Alim.	Exam.	Posit.
Junho, 1938	75	46	0			
Julho	66	40	0			
Agosto	68	55	0			
Setembro	22	15	0			
Outubro	0	0	0			
Novembro	14	12	4	4	2	2
Dezembro	6	5	0	2	4	4
Janeiro - Abril, 1939	23	19	8	2	2	0
Total	274	192	21	8	8	6

Em meados de Janeiro recebemos uma remessa de hamsters para experiências sobre a transmissão da leishmaniose visceral americana. Visto já estar extinta a colônia de *F. longipalpis* só pudemos utilizar os *F. intermedius*. Dos oito infectados de Janeiro a Abril, sete foram inoculados

em dois hamsters: três em um e quatro em outro, como se vê no quadro abaixo:

Quadro 6

Flebotomos utilizados para inoculação

Procedencia do <i>F. intermedius</i>	Data e hora da alimentação	Data de exame	Resultado	Inoculado em Hamster n.
Laboratorio	23-1-39, 16:00	27-1-39	+	2769
«	24-2-39, 14:30	28-2-39	+	2769
«	27-2-39, 16:00	28-2-39	—	
«	4-3-39, 15:30	8-3-39	+	2769
«	9-3-39, 15:00	11-3-39	—	
«	9-3-39, 15:00	13-3-39	—	
«	9-3-39, 15:00	14-3-39	—	
«	10-3-39, 15:00	13-3-39	—	
«	10-3-39, 15:00	14-3-39	—	
«	13-3-39, 15:00	16-3-39	+	Não aproveitado
«	23-3-39, 16:00	27-3-39	—	
«	23-3-39, 16:00	28-3-39	+	2799
Natureza * Laboratorio	23-3-39, 16:00	29-3-39	+	2799
«	27-3-39, 15:30	31-3-39	—	
«	28-3-39, 15:30	2-4-39	—	
«	11-4-39, 16:30	17-4-39	+	2799
«	11-4-39, 16:30	17-4-39	—	
«	12-4-39, 15:30	17-4-39	++	2799

* Capturado em Laranjeiras onde não ha Leishmaniose Visceral Americana.

Os resultados das inoculações confirmaram a capacidade de transmissão da Leishmaniose visceral americana pelo *F. intermedius* como se pode ver pela exposição feita com o Dr. Lobato Paraense em nota publicada no Brasil-Medico do qual transcrevemos o seguinte trecho:

« 1) Hamster n. 2769, inoculado a 27-1-39 com triturado de um *F. intermedius* de criação alimentado a 23-1-39 no cão « Não Te Importes », naturalmente infectado com *L. chagasi*. Reinoculado a 28-2-39 com um *F. intermedius* tambem de criação, alimentado a 24-2-39. Reinoculado a 8-3-39 com um *F. intermedius* de criação que havia sugado a 4-3-39. Estes tres flebotomos apresentavam raros flagelados com forma de leptomonas no tubo digestivo.

« 2) Hamster 2799, inoculado a 28-3-39 com triturado de um *F. intermedius* de criação, alimentado a 23-3-39 no cão « Não Te Importes ». Reinoculado a 29-3-39 com triturado de um *F. intermedius*, capturado em natureza e que havia sugado no dia 23. Reinoculado a 17-4-39 com dois *F. intermedius* de criação, alimentados a 12-4-39 e 13-4-39 respectivamente. Destes, tres apresentavam raras leptomonas no tubo digestivo, enquanto o quarto flebotomo, femea de criação alimentada a 12-4-39, apresentava abundantes leptomonas.

« O Hamster 2769 morreu a 23-3-39. Os esfregaços de fígado, baço e medula óssea foram negativos, assim como os cortes dos órgãos.

« O Hamster 2799 foi conservado em observação até 8-1-40. Nesse dia fizemos a biópsia da pele da coxa esquerda, com resultado positivo, tendo sido encontradas raríssimas Leishmanias em alguns dos cortes examinados. A 12-1-40 puncionamos o fígado, encontrando maior abundância de parasitos.

« Este último animal morreu a 20-1-40, e o exame microscópico dos órgãos confirmou a existência da infecção.

SUMARIO

Foi conseguida a criação em laboratório do *Flebotomus intermedius* e foram obtidos, de ovos colhidos em natureza, alguns *F. longipapis*. 231 fêmeas *F. intermedius* alimentadas em cães experimentalmente infectados pela *Leishmania chagasi* não se infectaram, enquanto que de 43 fêmeas alimentadas em um cão naturalmente infectado, 12 se infectaram; de 8 *F. longipapis* que sugaram este cão, 6 se infectaram.

O triturado de 3 *F. intermedius* apresentando flagelados com forma de leptomonas foi inoculado em um hamster, e o de 4 *F. intermedius* em outro. O segundo hamster, examinado nove meses após a primeira inoculação, mostrou-se infectado.

Estampa 1

Fig. 1 — Armadilha para captura de flebotomos.
Fig. 2 — Local ao lado do galinheiro.

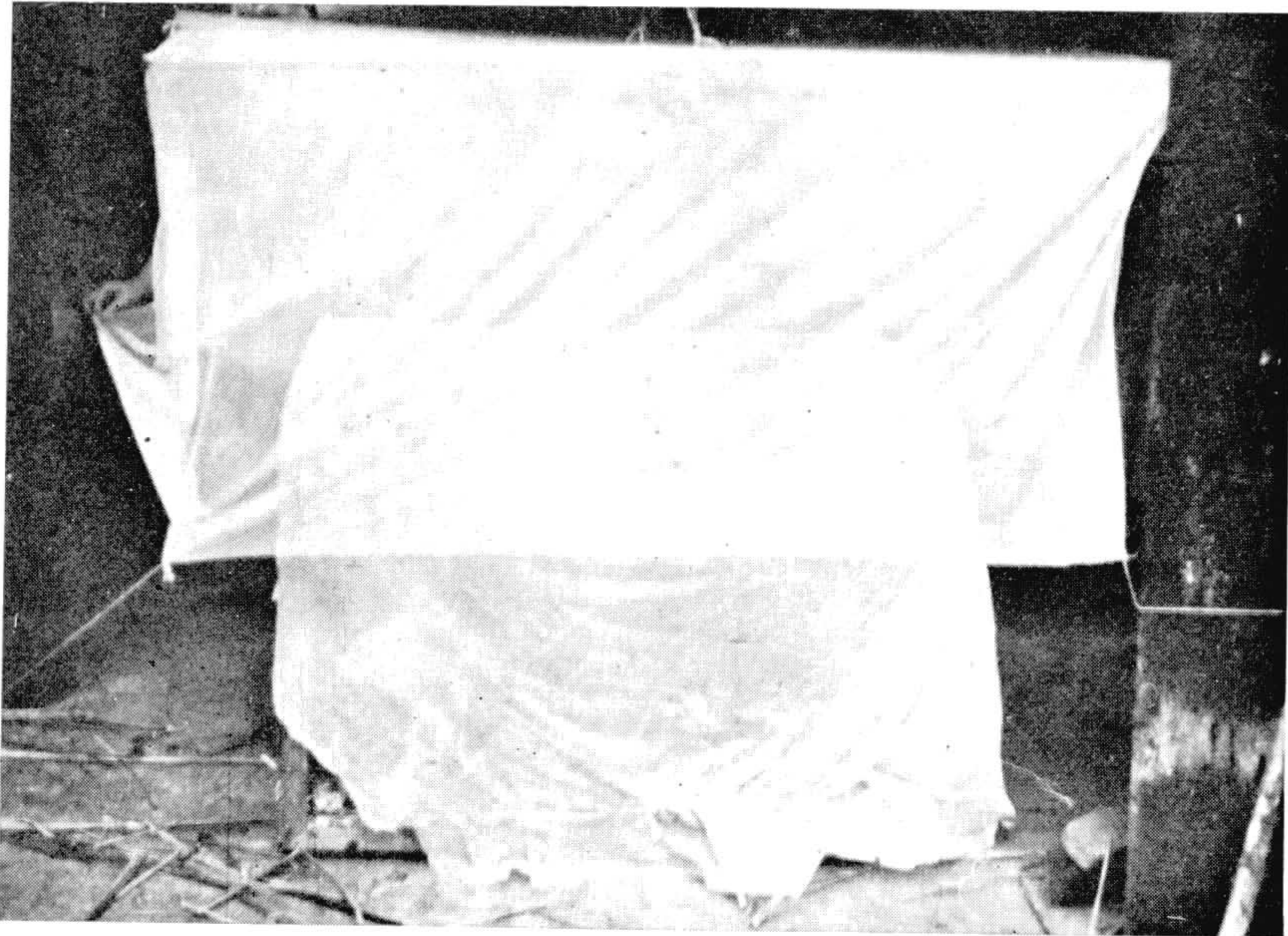


Fig. 1



Fig. 2

Chagas : Transmissão experimental da Leishmaniose visceral.

Estampa 2

- Fig. 3 — Tubos para a desova das femeas.
- Fig. 4 — Placas de Petri com as tiras de papel de filtro retiradas dos tubos de desova.

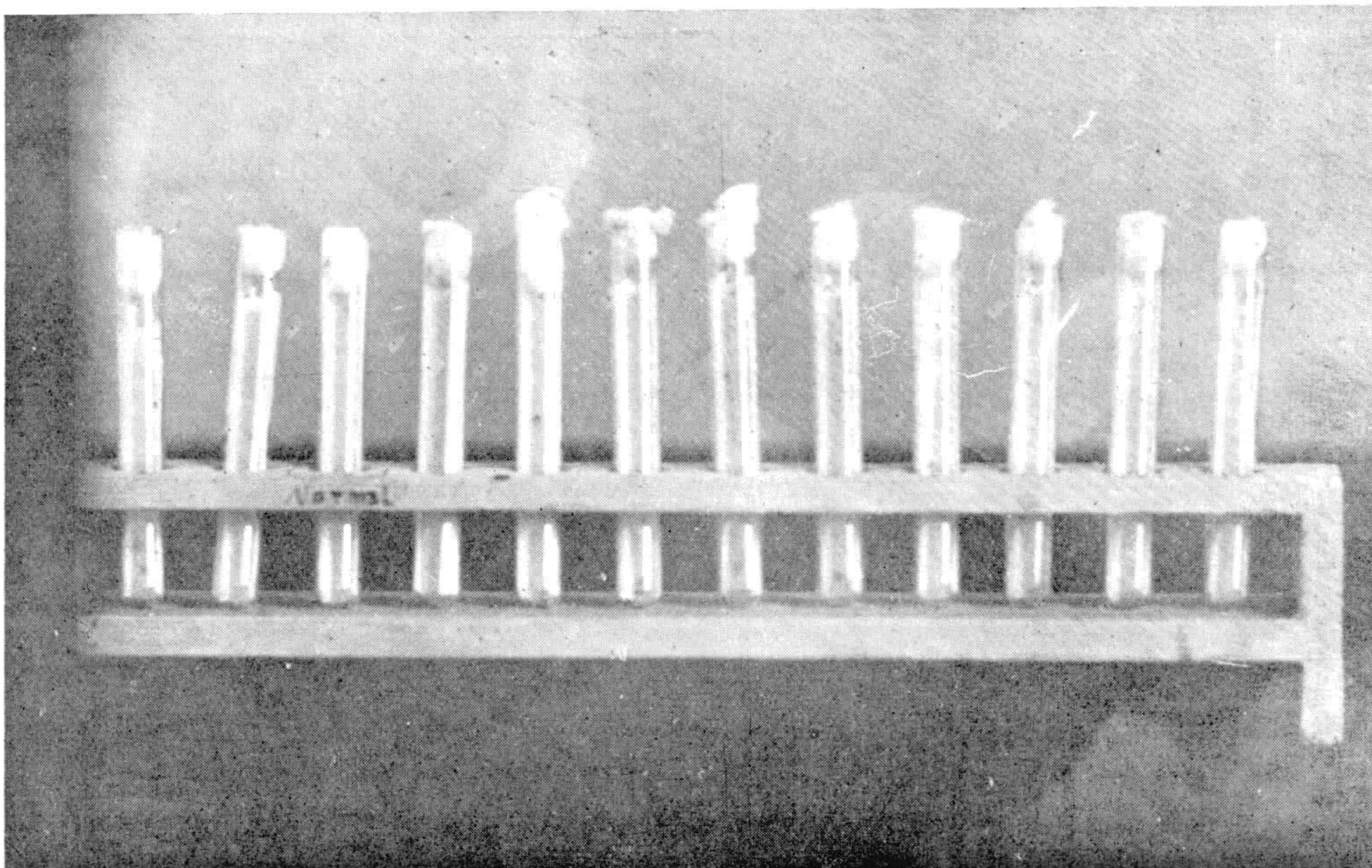


Fig. 3

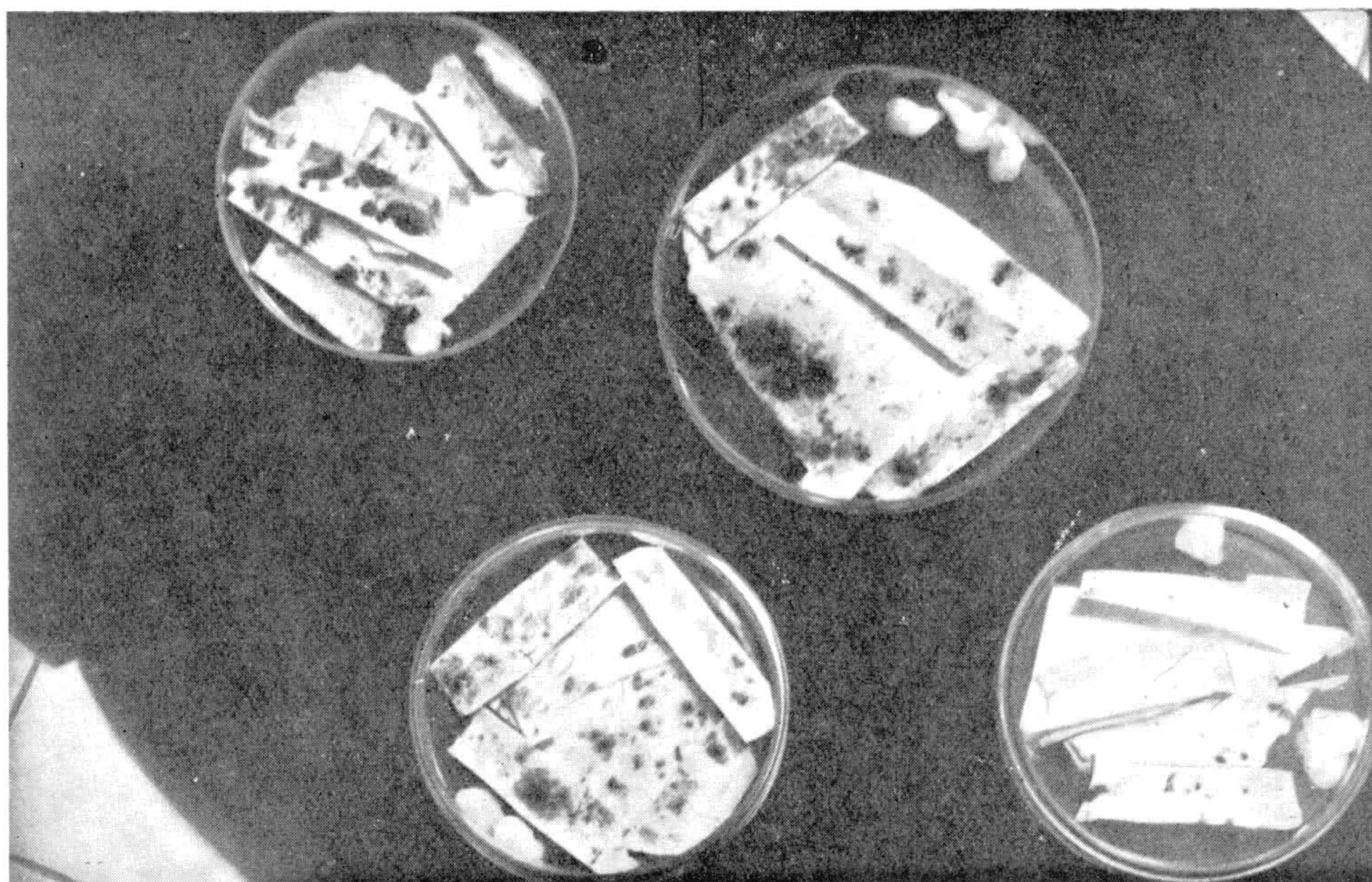


Fig. 4

Chagas: Transmissão experimental da Leishmaniose visceral.

Estampa 3

Fig. 5 — Larva que morreu na eclosão.
Fig. 6 — Larva no ultimo estadio.

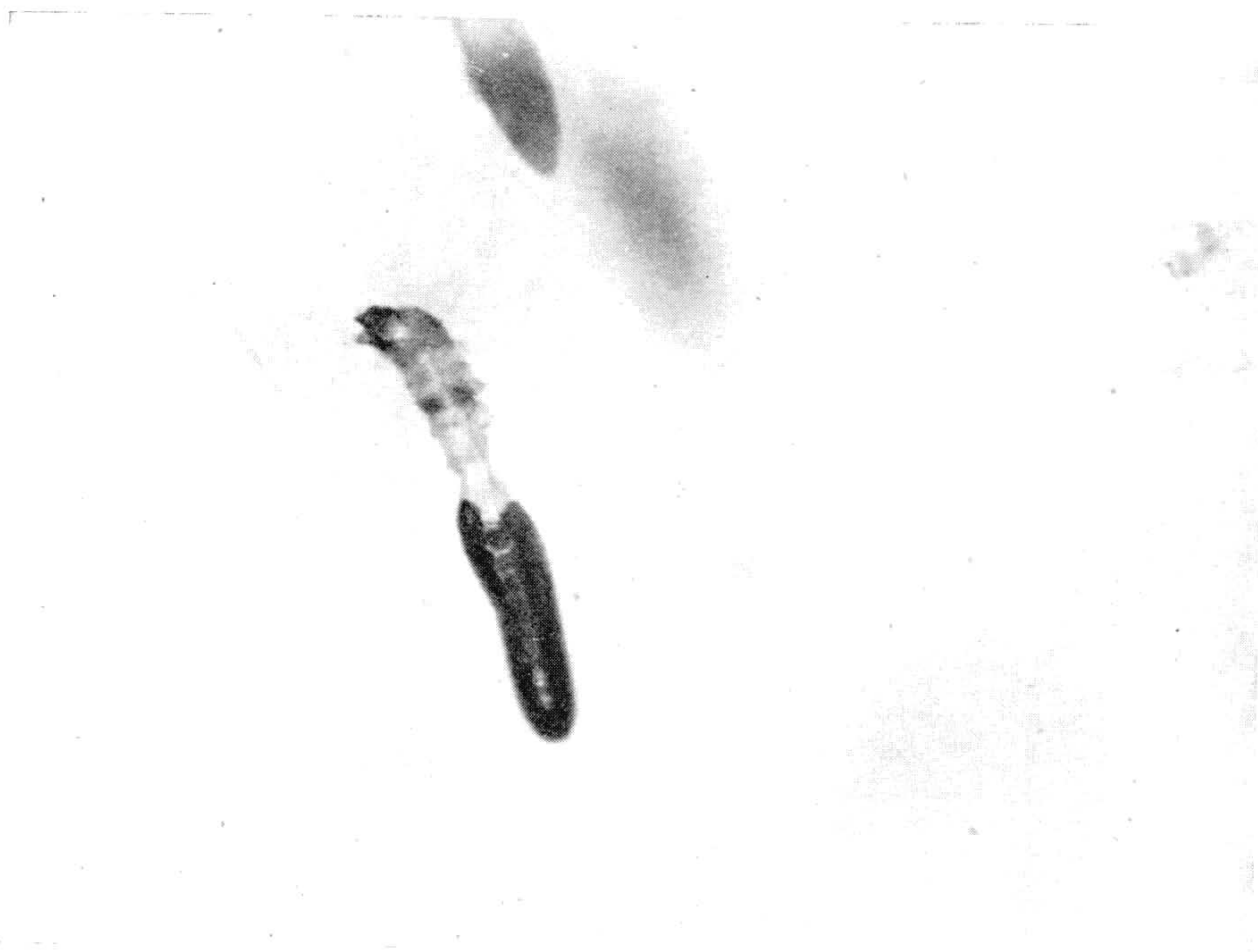


Fig. 5

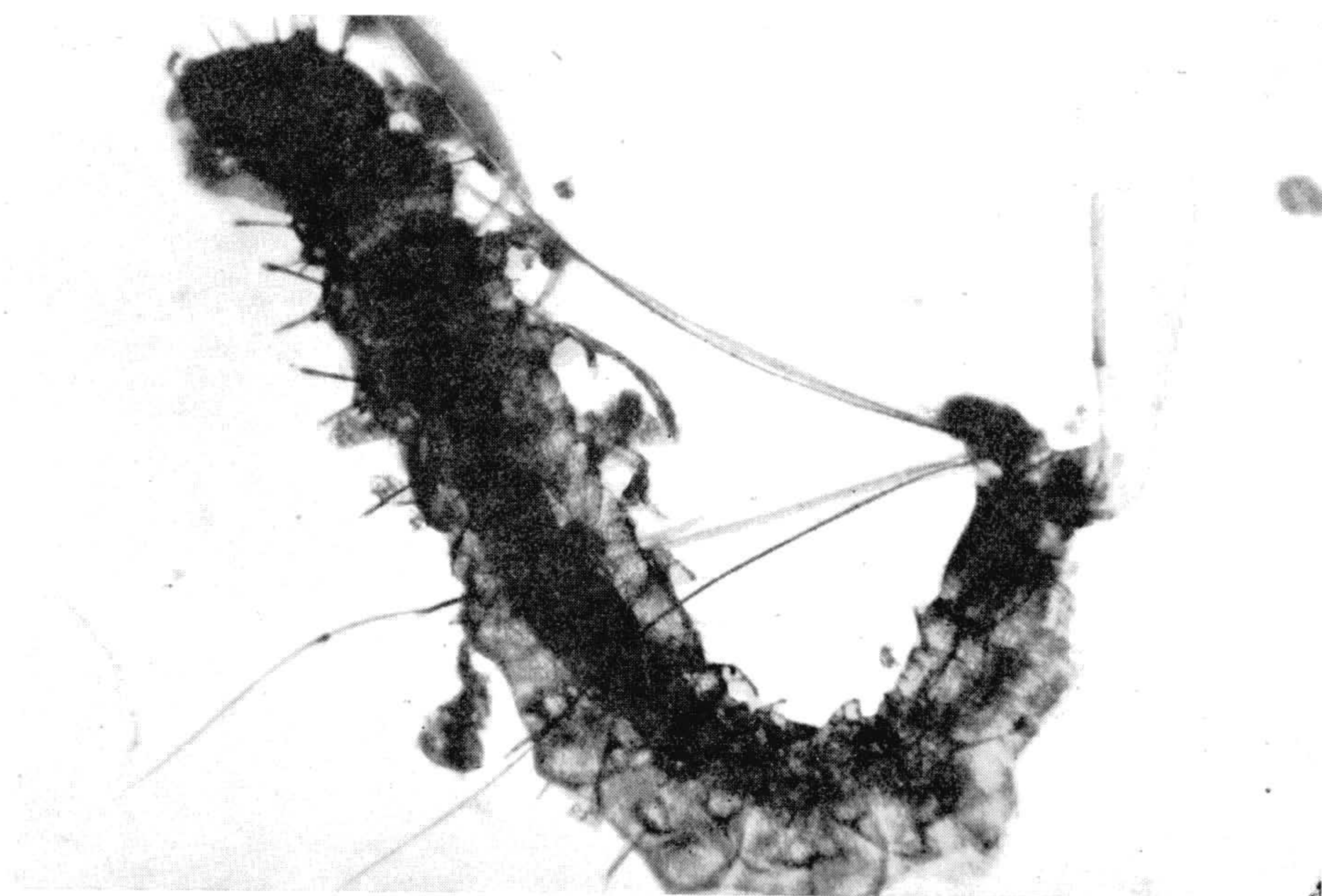


Fig. 6

Chagas: Transmissão experimental da Leishmaniose visceral.

Estampa 4

Fig. 7 — Pupa de *F. intermedius*.

Fig. 8 — *F. intermedius* adulto.

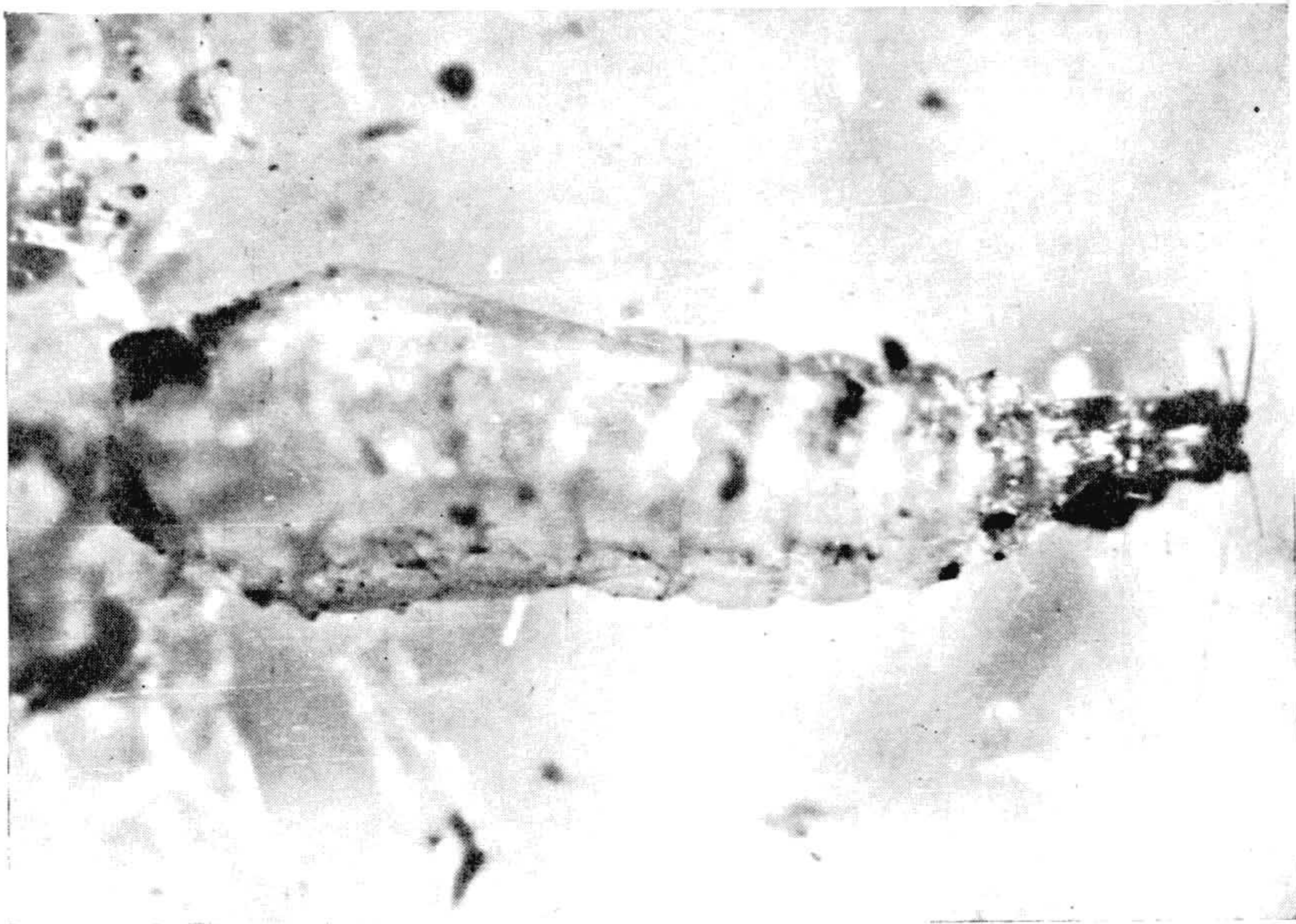


Fig. 7

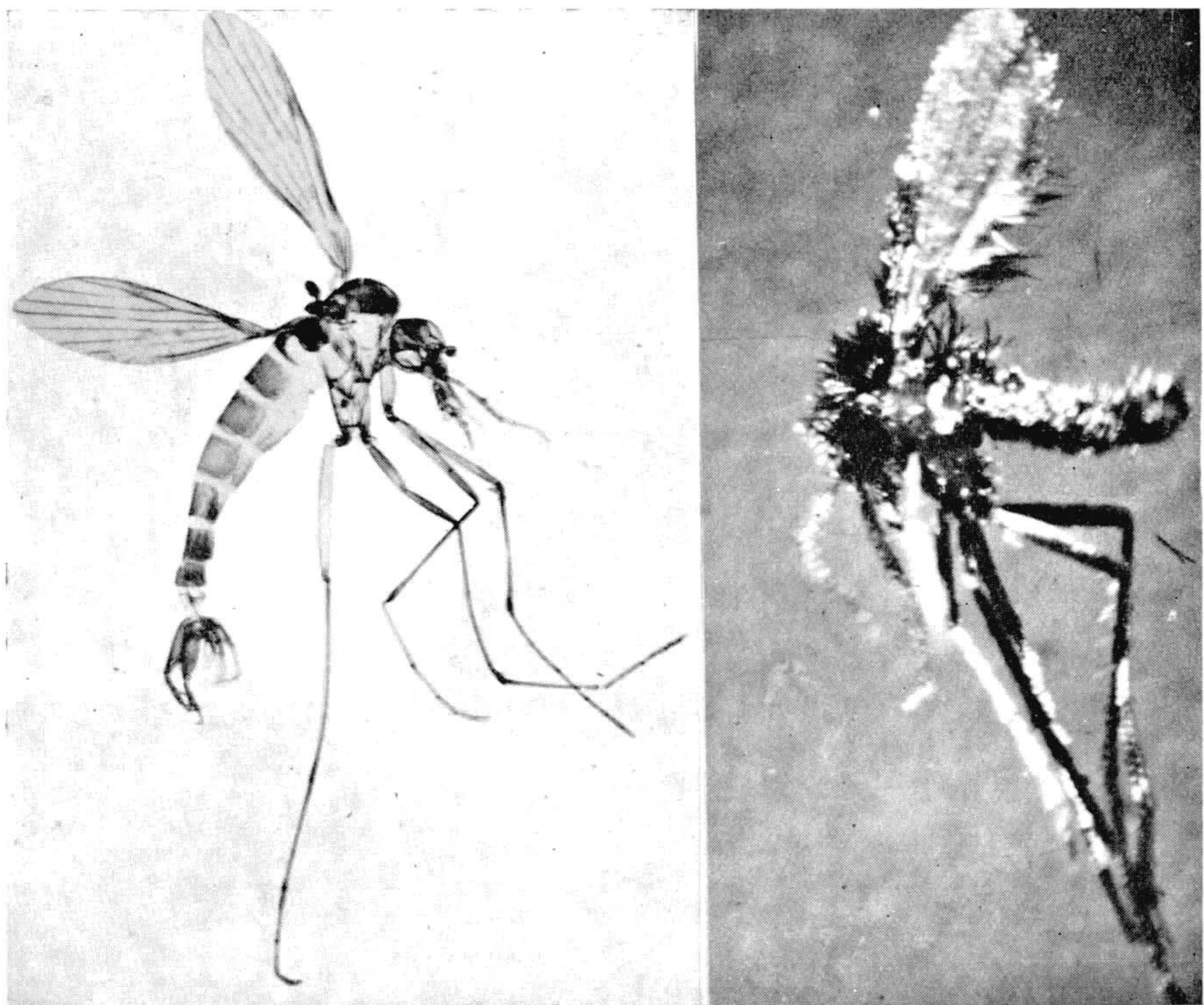


Fig. 8

Chagas: Transmissão experimental da Leishmaniose visceral.

Estampa 5

Fig. 9 — Gaiola para criação de flebotomos.

Fig. 10 — Alimentação de flebotomos em um cão infectado.

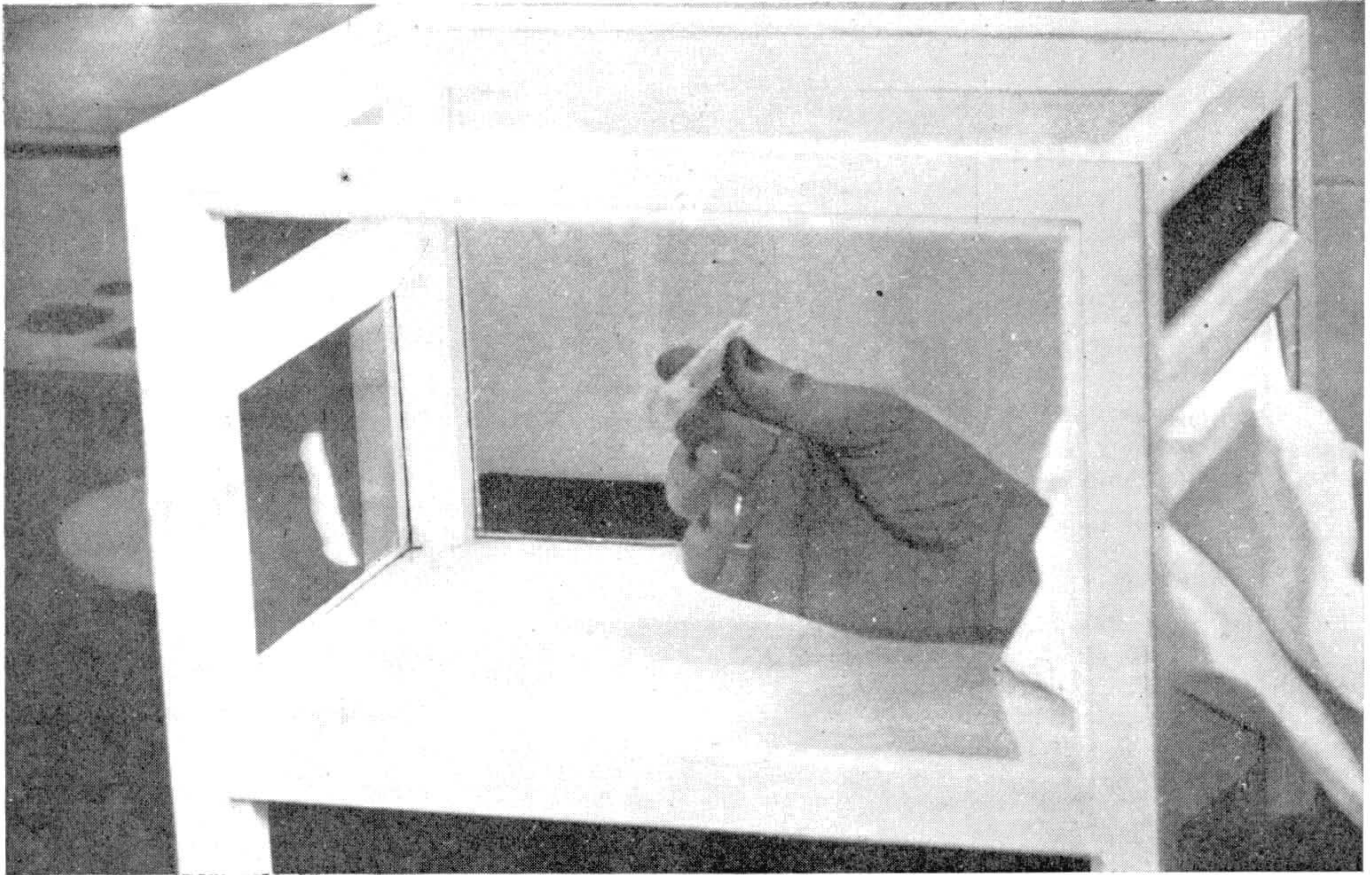


Fig. 9

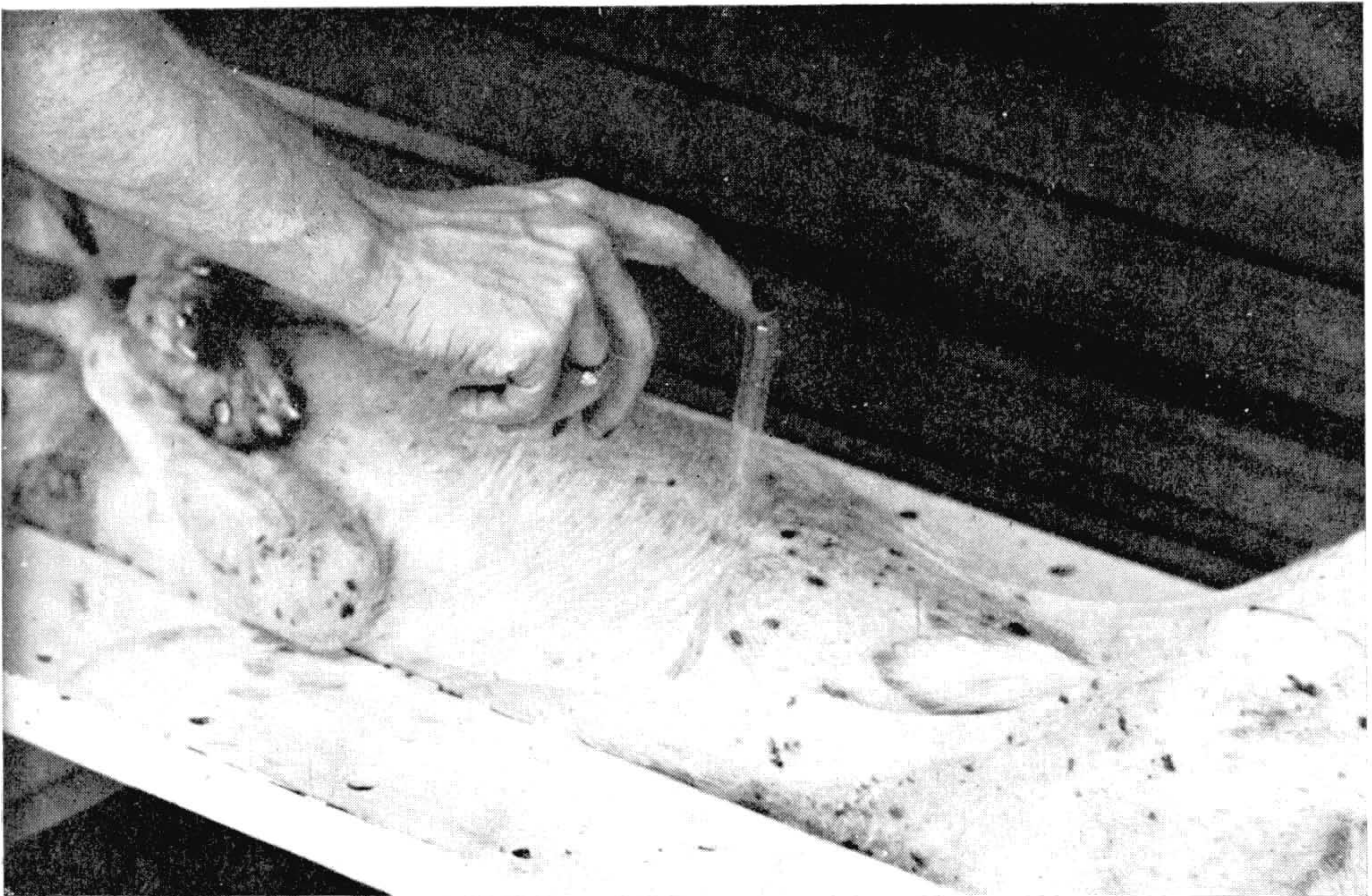


Fig. 10

Chagas: Transmissão experimental da Leishmaniose visceral.