

## ESTUDOS SÔBRE A REAÇÃO DA PRECIPITINA APLICADA À IDENTIFICAÇÃO DE SANGUE INGERIDO POR TRIATOMÍNEOS

Astolpho Ferraz de SIQUEIRA (1)

### RESUMO

A reação da precipitina, executada em tubos de vidro de pequeno calibre, foi estudada com o fim de ser aplicada na identificação de sangue ingerido por triatomíneos.

Foram usados tubos com 40 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro interno. Os tubos, tendo recebido o sôro precipitante por capilaridade, eram fixados em suportes apropriados e recebiam o antígeno, adicionado cuidadosamente por meio de uma pipeta de Pasteur com extremidade muito afilada. Os resultados eram registrados após 2 horas de incubação em temperatura ambiente.

Os soros precipitantes foram preparados em coelhos por injeções intramusculares de sôro previamente precipitado por alúmen de potássio, sôro êste proveniente de vários animais. Antes do uso os soros precipitantes foram absorvidos com antígenos heterólogos a fim de melhorar a sua especificidade.

O teste da precipitina foi aplicado ao conteúdo intestinal de triatomíneos que haviam sugado previamente em um animal ou em animais de espécies diferentes e mantidos no laboratório por vários meses. O teste foi também aplicado em triatomíneos que, sacrificados logo após a refeição sanguínea, foram conservados no laboratório por vários meses.

A técnica é facilmente executada com pequenas quantidades dos reagentes e as leituras foram satisfatórias.

“Barbeiros” que sugaram em uma espécie de animal e que ingeriram de 150 a 350 mg de sangue deram reações positivas 120 dias após a refeição. “Barbeiros” que sugaram em duas espécies de animais deram resultados positivos quando soros precipitantes correspondentes foram usados, permitindo a identificação do sangue das duas espécies envolvidas.

“Barbeiros” sacrificados e preservados secos em temperatura ambiente permitiram reações positivas até 3 meses depois da refeição.

### INTRODUÇÃO

A identificação de sangue ingerido por triatomíneos, além de ser importante como dado epidemiológico, é método que poderá vir a constituir auxiliar valioso para a procura de focos de reinfestação em localidade

onde se tenha conseguido a erradicação de “barbeiros” domiciliares. Julgamos portanto de grande atualidade o estudo e a padronização de uma técnica que se adapte às condições dos hematófagos referidos.

Fac. Med. Ribeirão Preto, da Univ. de São Paulo — Dep. Parasitol. (Prof. M. P. Barretto).  
(1) Assistente.

Nota — Os dados dêste trabalho constituíram parte da tese de doutoramento defendida pelo autor em 1958.

A reação da precipitina, de longa data usada na identificação de sangue para vários fins, tem sido também empregada no reconhecimento de sangue ingerido por numerosos artrópodes. Usada por ROMANA<sup>13</sup> e mais tarde por CORRÊA & AGUIAR<sup>4</sup>, mostrou-se útil na identificação de sangue ingerido por triatomíneos. WEITZ<sup>18</sup>, aponta-a como superior às demais técnicas usadas desde que uma relativa especificidade seja conseguida à custa de soros precipitantes previamente absorvidos.

No presente trabalho estudaremos o comportamento da reação de precipitação quando aplicada na identificação do conteúdo intestinal de triatomíneos alimentados e mantidos em laboratório. As condições normais do material à nossa disposição e peculiaridades inerentes ao caso especial ditaram algumas adaptações por nós introduzidas na execução da reação. A preparação e estandarização dos soros precipitantes foram feitas segundo o método usado por WEITZ<sup>16</sup>. Na aplicação do método abordamos aspectos que julgamos mais importantes e exequíveis dentro das nossas possibilidades.

Este trabalho consta de três partes: 1.º) estudo e padronização da reação; 2.º) preparação dos soros precipitantes; 3.º) aplicação da técnica a triatomíneos alimentados e conservados em laboratório.

## PARTE I — ESTUDO E ADAPTAÇÃO DA REAÇÃO

A reação da precipitina manifesta-se por uma precipitação quando o soro precipitante e o antígeno homólogo são misturados em proporções adequadas. Quando o antígeno é pôsto sobre o soro, formando uma superfície nítida de separação, a reação se torna mais visível e se manifesta em ampla zona de concentrações dos reagentes. Assim executada é conhecida como técnica interfacial.

### 1. MATERIAL E MÉTODOS

A. *Tubos de reação* — Usamos, com 2 mm de diâmetro e 40 mm de comprimento, cortados de varas de vidro "Pirex" ("code" 234040), de calibre uniforme em tôda a extensão. Antes do uso, os tubos foram colocados por 24 horas em mistura sulfocrômi-

ca, lavados em água de torneira e em água destilada e secados. Repetindo-se a operação de limpeza, foram usados numerosas vezes.

B. *Pipetas* — Foram usadas pipetas de Pasteur estiradas no laboratório. No preparo delas, tínhamos o cuidado de fazer com que a extremidade afilada tivesse um calibre muito reduzido. As varas de vidro empregadas na confecção das pipetas, depois de cortadas eram colocadas na mistura sulfocrômica por 24 horas; depois de lavadas eram estiradas e usadas uma única vez. Assim procedemos porque a lavagem das pipetas é muito difícil.

C. *Suportes dos tubos* — Empregamos suportes de madeira (25 cm × 2 cm × 1 cm) com 15 perfurações na face superior (6 mm de diâmetro), obstruídas com massa de modelagem.

D. *Aparelho de leitura* — Improvisado no laboratório, consta de um quebra-luz fluorescente, com fundo escuro e uma lupa.

E. *Sôro precipitante* — Sôro de coelho imunizado por injeções intramusculares de sôro de galinha.

F. *Antígeno* — Sôro de galinha.

G. *Técnica da reação* — O teste depende da ação entre o antígeno e o soro-imune correspondente. Por causa da maior densidade do soro, apenas uma pequena difusão dos líquidos ocorre na zona de contato e o precipitado que se forma nesta região aparece como um anel branco. A reação positiva é indicada pelo aparecimento deste anel. É importante na execução da reação que se evite a mistura dos reagentes ao introduzi-los no tubo. O soro precipitante, introduzido por capilaridade nos tubos adequados, atinge a altura de mais ou menos 8 mm que corresponde a um volume aproximado de 25 mm<sup>3</sup>. Fixado na massa de modelagem do suporte pela extremidade que contém o soro, recebe em seguida o antígeno que é adicionado com o auxílio das pipetas; a ponta da pipeta pode chegar à altura do soro ou então pode-se deixar escorrer o líquido pela parede do tubo. O volume de antígeno adicionado é mais ou menos o do soro. A lei-

tura da reação é feita através de uma lente, contra fundo escuro, no aparelho já referido. As reações foram feitas em temperatura ambiente e os contrôles eram feitos com o soro precipitante e solução fisiológica.

## 2. RESULTADOS E CONCLUSÕES

A técnica, como executada, permitiu-nos trabalhar com volume reduzido de reagentes; o manuseio dos apetrechos pareceu-nos relativamente simples e os precipitados perfeitamente visíveis.

O uso de tubos com diâmetro interno menor que 2 mm não nos permitiram leituras satisfatórias. Assim, tubos com 1,5 mm de diâmetro interno, usados por ARNOLD & col.<sup>2</sup> e que permitiram resultados paralelos com reações executadas em tubos de grande calibre, em nossas mãos não se mostraram adequados; menos satisfatórios ainda os tubos com diâmetro externo variando entre 1,2 e 1,5 mm preconizados por SCHUBERT & HOLDEMAN<sup>14</sup>.

A adição dos reagentes, do modo como foi feita, teve, a nosso ver, algumas vantagens; além de fácil, corrigiu alguns defeitos por nós verificados nas técnicas usadas por alguns autores. Assim, por exemplo, ARNOLD & col.<sup>2</sup>, SCHUBERT & KELLEY<sup>15</sup> e WEITZ<sup>17</sup>, com a preocupação de executar com rapidez vários testes simultâneos, aproveitam o efeito da capilaridade para a captação do antígeno e do soro. Parece-nos que tubos contendo antígeno, ao serem colocados em contato, pelas aberturas inferiores, com o soro a ser usado na reação, condicionam a sua contaminação. Por outro lado, verificamos que a passagem do antígeno molha a parede interna dos tubos e, em conseqüência, quando empurrado pelo soro precipitante não forma com este uma superfície nítida de separação. Usando a pipeta para a introdução do antígeno, o escorrimento do líquido pela parede do tubo serve como prova de limpeza do mesmo; em tubos mal lavados e engordurados é praticamente impossível fazer escorrer a solução do antígeno.

A leitura da reação com duas horas de incubação, segundo WEITZ<sup>18</sup>, foi bastante satisfatória em nossa experiência; nunca nos aconteceu verificar o aparecimento de precipitado se já não tivesse aparecido neste pe-

ríodo de observação. Algumas vezes, reações nitidamente positivas na primeira hora, pela lenta difusão do anel de precipitado, deixavam dúvidas em leituras subseqüentes; por isto, adotando o tempo de duas horas para a leitura definitiva, liamos também várias vezes no decorrer deste tempo. A verificação das reações depois de 24 horas mostrava-nos, quase sempre, um pequeno depósito de precipitado no fundo dos tubos; pretendendo uma confirmação das leituras pela presença destes depósitos verificamos que, às vezes, reações nitidamente positivas nas duas primeiras horas deixavam de apresentar os depósitos referidos.

Em conclusão, a técnica, com os detalhes referidos, satisfaz os requisitos necessários à precisão dos resultados e à poupança do material a usar. Com referência à rapidez do método, reconhecemos impossível atingir o rendimento conseguido por vários autores e principalmente aquele referido por WEITZ<sup>17</sup>, que conseguiu provar 200 espécimes contra 6 soros precipitantes em uma única manhã. Em geral, neste tempo conseguimos examinar apenas 20 espécimes contra 15 soros, o que representa um rendimento quatro vezes menor que o do autor citado.

## PARTE II — PREPARAÇÃO DOS SOROS PRECIPITANTES

Segundo PROOM<sup>11</sup>, a imunização de coelhos com injeções endovenosas ou intraperitoneais é mal tolerada pelos animais e dá, como resultado, soros precipitantes de baixos títulos. WOLFE<sup>21</sup> e PROOM<sup>11</sup>, chamam a atenção para o fato de que a especificidade decresce com o número de injeções e para contornar este óbice, WEITZ<sup>16</sup> fez a absorção dos soros precipitantes com antígenos heterólogos; entretanto, em se tratando de animais de espécies zoológicamente próximas, o uso de soros assim absorvidos não permitiu a identificação. Baseado na experiência de UHLENHUTH (apud<sup>16</sup>), WEITZ<sup>16</sup> tentou a obtenção de soros mais específicos pela imunização de um animal com o soro do outro zoológicamente próximo. Pelas suas conclusões, a alta especificidade só foi conseguida em alguns casos, mas os soros precipitantes obtidos apresentaram títulos muito baixos.

Em nosso trabalho, imunizamos coelhos pelo método de PROOM<sup>11</sup> e absorvemos os soros precipitantes pela técnica usada por WEITZ<sup>16</sup>.

#### 1. MATERIAL E METODOS

A. *Antígenos* — Os antígenos usados foram os soros dos seguintes animais: homem, porco, boi, cabra, cão, gato, cavalo, tatu (*Dasyus novencinctus* e *Euphractus sexinctus*), gambá (*Didelphis marsupialis aurita* e *D. surita paraguayensis*), rato (*Rattus norvegicus albinus*), morçêgo (*Eumops perotis perotis*), lagarto (*Ameiva ameiva*), galinha, pombo e pardal.

Os animais foram sangrados na veia ou no coração e o sangue foi deixado em temperatura ambiente para coagulação e separação do sôro. Este foi distribuído em ampôlas de 5 ml e 1 ml que depois de fechadas foram guardadas em estado congelado. Para a inoculação dos coelhos o antígeno foi descongelado e tratado da maneira seguinte: num balão de 250 ml diluíamos 5 ml de sôro com 16 ml de água destilada e adicionávamos 18 ml de uma solução a 10% de alúmen de potássio ( $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) em água destilada; ajustado o pH 6,5 com solução 5N de NaOH, centrifugávamos a mistura em tubos de 45 ml e lavávamos o precipitado por duas vêzes em solução fisiológica mertiolatada (1:10.000). O precipitado final, homogenizado em 20 ml da solução mertiolatada, era usado para as inoculações.

B. *Método de imunização* — Coelhos adultos com mais de dois quilos foram usados para a imunização. Para cada antígeno foram usados dois animais que receberam injeções de 5 ml em cada perna traseira. Todos os coelhos receberam 5 inoculações espaçadas de 12 dias. A colheita do sangue foi feita por sangrias totais, puncionando o coração com o máximo de cuidado para evitar a contaminação do sangue. Após a coagulação dêste, o sôro foi removido, centrifugado e guardado em geladeira até que fôssem feitas as dosagens e absorções.

C. *Dosagem dos soros precipitantes* — Vários autores, entre eles SCHUBERT & KELLEY<sup>14</sup>, dosam os soros precipitantes fazendo-os reagir em diluições crescentes com uma

diluição fixa do antígeno; outros, como ARNOLD & col.<sup>2</sup>, diluem tanto o sôro como o antígeno. Como pretendemos, de acôrdo com CRUZ<sup>5</sup>, usar o sôro precipitante no estado não diluído, na determinação do título do mesmo fizemo-lo reagir sem diluição contra diluições crescentes, em progressão geométrica de razão 2, dos antígenos homólogos. O título foi definido pelo inverso da diluição do antígeno que provocou formação de precipitado após duas horas de incubação em temperatura ambiente.

D. *Determinação da especificidade* — Autores que usam soros precipitantes não específicos e se preocupam com o problema das reações cruzadas, como, por exemplo, CARROL & KING<sup>3</sup> e SCHUBERT & KELLEY<sup>15</sup>, procuram eliminá-las à custa da diluição do antígeno em identificação ou diluindo tanto antígeno como o sôro precipitante. Autores que empregam soros precipitantes previamente absorvidos definem a especificidade pela diluição do antígeno heterólogo que não reage em presença do sôro não diluído. WEITZ<sup>16</sup>, por exemplo, considera específico os soros que não provocam reação quando postos em contato com antígenos heterólogos diluídos até 1:10; lembra, ainda, que na determinação do título, o tempo e temperatura de incubação devem ser os mesmos que os obedecidos na aplicação do método.

Para conhecer o grau de especificidade dos nossos soros precipitantes, fizemo-os reagir não diluídos com diluições crescentes dos antígenos heterólogos, por duas horas em temperatura ambiente.

E. *Absorção dos anticorpos não específicos* — O teor de antígenos necessário para a absorção do anticorpo correspondente é calculado por WEITZ<sup>16</sup> efetuando absorções preliminares em amostras dos soros. Verificada a menor quantidade de cada antígeno que provoca a absorção completa de cada sôro, é feita uma mistura em proporções corretas, dos antígenos heterólogos, para ser adicionada ao volume total do sôro precipitante em preparação. Os resultados do autor mostram que a absorção completa pode ser conseguida até com a têtça parte do volume da mistura. Em sua opinião, êste fato indica que os sangues dos animais contêm

antígenos comuns que agem simultaneamente contra vários anticorpos. Baseado nestes resultados, WEITZ<sup>16</sup> aconselha que se faça, na prática, a adição de uma parte da mistura de antígenos heterólogos com 100 partes do soro precipitante, e que se refaça a absorção dos anticorpos remanescentes com antígenos correspondentes, obedecendo a proporção de 1:1.000.

Amparados na experiência deste autor, preferimos fazer a absorção dos soros precipitantes adicionando uma parte da mistura de antígenos heterólogos a 100 partes de soro a ser absorvido. Adicionado o antígeno, incubávamos o soro por duas horas a 37°C e o deixávamos por 12 horas a 4°C; depois de centrifugado, o sobrenadante era provado com os antígenos usados na absorção, diluídos a 1:10. Aquêles que ainda provocassem reação eram adicionados novamente na proporção de 1:1.000 e o soro sofria o tratamento acima descrito. Repetindo os testes com êstes antígenos, fazíamos ainda uma última absorção no caso de alguns dêles continuarem a reagir.

F. *Conservação dos soros precipitantes* — WEITZ<sup>16</sup> contraindica a adição dos preservativos usuais para a conservação dos precipitantes porque a turvação que se desenvolve em consequência dêles dificulta a leitura das reações. O autor não aconselha também o método preconizado por RICE & BARBER<sup>12</sup>, em que o soro é diluído em glicerina fenolada, porque além de o soro ter o seu título diminuído pela diluição, esta impede a separação nítida entre o soro e o antígeno no tubo de reação. Na opinião do autor citado é satisfatório o congelamento do soro a -10°C; o ideal seria, no entanto, a secagem do soro no estado congelado. Êste processo obrigaria a extração prévia de lipóides que poderia ser feita pelo método de MAC FARLANE<sup>10</sup>.

Como o nosso intuito é o de padronizar uma técnica de maior simplicidade possível, julgamos oportuno estudar o comportamento do soro precipitante conservado no congelador a -18°C. Por isto os nossos soros, desde que dosados e absorvidos, foram filtra-

dos em placas esterilizantes (Seitz EK), repartidos em alíquotas de 1 ml, ampolados e colocados no congelador.

## 2. RESULTADOS E CONCLUSÕES

A. *Títulos dos soros precipitantes* — Os resultados das dosagens dos 15 soros precipitantes com os antígenos homólogos e heterólogos estão resumidos no quadro I.

Com exceção dos soros anticabra, antipombo e antipardal, com títulos homólogos próximos de 10.000, os demais se apresentaram com títulos que variaram entre 20.000 e 40.000. Reações inespecíficas ocorreram com a maioria dos soros preparados. Em alguns casos, como nos soros antiboi, anticabra e antigato, os títulos homólogos foram iguais aos obtidos com os antígenos heterólogos de cabra, boi e cão respectivamente. Os soros antigambá e antimorcêgo não reagiram com os antígenos provenientes dos demais mamíferos experimentados. O soro antilagarto mostrou-se específico com relação aos antígenos experimentados. Os soros antiaves não reagiram com os antígenos dos demais animais mas reagiram entre si.

Os soros precipitantes obtidos por WEITZ<sup>16</sup> apresentaram-se com títulos mais altos que os nossos mas as reações inespecíficas dos seus soros são proporcionalmente muito mais intensas que as dos nossos. Como, na opinião do mesmo autor (WEITZ<sup>16</sup>), os soros precipitantes com títulos homólogos próximos de 20.000 são suficientes, não julgamos necessário e talvez nem mesmo conveniente, prosseguir nas inoculações com o fim de obter soros com títulos mais altos. A maioria dos autores emprega soros precipitantes com títulos mais baixos que os dos nossos, e mesmo alguns daqueles que seguiram o método de imunização por nós usado, como por exemplo DOWNE & MORRISON<sup>6</sup>, acham eficientes soros de títulos homólogos próximos de 5.000.

B. *Comportamento dos soros precipitantes após a absorção dos anticorpos inespecíficos* — No quadro II apresentamos os resultados das reações quando os soros imunes

QUADRO I

Títulos das reações realizadas antes da absorção com vários antígenos

Antígenos	Soros														
	Homem	Porco	Boi	Cabra	Cão	Gato	Cavalo	Tatu	Gambá	Rato	Morcego	Lagarto	Galinha	Pombo	Pardal
Anti-homem	30.720	5.120	2.560	2.560	2.560	5.120	5.120	5.120	—	1.280	2.560	—	—	—	—
Antiporco	2.560	25.600	5.120	5.120	1.280	5.120	5.120	5.120	640	640	1.280	—	—	—	—
Antiboi	640	5.120	40.960	40.960	320	5.120	5.120	2.560	—	—	—	—	—	—	—
Anticabra	320	1.280	10.240	10.240	160	320	320	1.280	640	640	—	—	—	—	—
Anticão	320	1.280	80	160	30.720	5.120	320	640	160	—	—	—	—	—	—
Antigato	5.120	20.480	320	5.120	40.960	40.960	5.120	5.120	320	—	—	—	—	—	—
Anticavalo	5.120	1.280	1.280	5.120	5.120	5.120	25.600	5.120	160	—	—	—	—	—	—
Antitatu	5.120	5.120	160	1.280	5.120	2.560	1.280	20.480	160	—	—	—	—	—	—
Antigambá	—	—	—	—	—	—	—	—	30.720	—	—	—	—	—	—
Anti-rato	—	320	320	320	—	1.280	2.560	2.560	1.280	19.200	—	—	—	—	—
Antimorcego	—	—	—	160	—	—	—	160	—	—	40.960	—	—	—	—
Antilagarto	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	19.200	—	—	—
Antigalinha	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	30.720	5.120	2.560
Antipombo	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2.560	10.240	2.560
Antipardal	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5.120	5.120	10.240

O sinal (—) refere-se a reações negativas com antígenos diluídos a 1:10.

QUADRO II

Titulos das reações realizadas depois da absorção com vários antígenos

Antígenos Soros	Homem	Porco	Boi	Cabra	Cão	Gato	Cavalo	Tatu	Gambá	Rato	Morcego	Lagarto	Galinha	Pombo	Pardal
	Anti-homem	20.000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Antiporco	—	20.000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Antiboi	—	—	25.600	10.240	20	—	80	—	—	—	—	—	—	—	—
Anticabra	—	—	1.280	3.200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Anticão	—	—	—	—	12.800	80	20	—	—	—	—	—	—	—	—
Antigato	—	—	—	—	—	15.000	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Anticavalo	40	40	—	20	—	40	15.000	—	—	—	—	—	—	—	—
Antitatu	20	20	—	—	—	20	20	10.000	—	—	—	—	—	—	—
Antigambá	—	—	—	—	—	—	—	—	30.000	—	—	—	—	—	—
Anti-rato	—	—	—	—	—	—	—	—	—	12.800	—	—	—	—	—
Antimorcego	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	30.000	—	—	—	—
Antilagarto	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	15.000	—	—	—
Antigalinha	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	30.000	5.120	2.560
Antipombo	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	160	160	160
Antipardal	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	40	40	160

O sinal (—) refere-se a reações negativas com antígenos diluídos a 1:10.

foram postos a reagir com os antígenos homólogos e heterólogos depois de terem sido absorvidos.

Confrontando êstes resultados com aquêles apresentados no quadro I, verificamos que foi obtida uma melhoria geral na especificidade dos soros precipitantes em consequência da absorção dos anticorpos heterólogos. A análise detalhada dos números apresentados mostra que alguns dos soros imunes, embora tenham se tornado específicos para a maioria dos antígenos usados, reagiram ainda intensamente com alguns dêles. Estão entre êstes os soros antiboi e anticabra, no grupo dos mamíferos, e os soros antipombo e antipardal, no grupo das aves. O sôro antigalinha não foi absorvido com os antígenos heterólogos que com êle reagiram, isto é, soros de pombo e de pardal. Os outros soros precipitantes, se bem reajam, alguns dêles, com antígenos heterólogos, a intensidade dessas reações inespecíficas é relativamente pequena; dizemos relativamente pequena, tendo em vista os títulos homólogos apresentados pelos mesmos.

Os títulos dos soros precipitantes diminuiu acentuadamente, depois que foi feita a absorção dos anticorpos heterólogos. Os soros antipombo e antipardal, além de terem perdido quase que tôda a atividade, guardaram a inespecificidade inicial a ponto de reagirem com intensidade igual frente aos antígenos homólogos e heterólogos. O soro anticabra, já de início pouco ativo, apresentou-se com título muito baixo depois da absorção.

Repetimos a preparação de alguns soros precipitantes com características pouco adequadas para a aplicação do teste. Assim, novos soros anticabra, anticavalo e antitatu foram preparados pela mesma técnica e absorvidos, como os anteriores, fazendo exceção o sôro anticabra, ao qual deixamos de adicionar o sôro de boi. Em vista da experiência já nos ter mostrado a impraticabilidade de fazer com que os soros antiboi e anticabra pudessem ser absorvidos, com os antígenos provenientes de cabra e boi, respectivamente, evitamos a adição de sôro de boi na absorção dos anticorpos heterólogos do sôro precipitante anticabra. Assim fazendo, foi possível conseguir um sôro-imune

com título 15.000. Os outros dois novos soros precipitantes, anticavalo e antitatu, apresentaram, depois de absorvidos pelos antígenos heterólogos, os títulos 30.000 e 12.800, respectivamente.

Os nossos resultados, pelo menos em alguns aspectos, diferem dos obtidos por WEITZ<sup>16</sup>. Assim, quando o autor faz a absorção do sôro-imune anti-homem com uma mistura dos antígenos boi, carneiro, porco, cavalo, cão e gato, verifica o desaparecimento das reações inespecíficas e a persistência da reação específica igual à que o sôro apresentava antes da absorção. Em nossa observação, em que o sôro anti-homem foi absorvido pelos antígenos porco, boi, cão, gato, cavalo, tatu e cabra, não obtivemos o mesmo resultado, pois o título específico do mesmo foi modificado em consequência da absorção. Em outro ponto ainda os nossos resultados são diferentes porque, ao fazer a absorção do sôro anticabra com vários antígenos heterólogos, entre êles o sôro de boi, o autor citado verifica a eliminação de tôdas as reações cruzadas, fazendo exceção apenas para o sôro de carneiro; os nossos resultados mostram que o sôro anticabra, reagindo igualmente com os antígenos boi e cabra antes da absorção, passou a reagir com menor intensidade com o antígeno boi, mas ainda com título apreciável, depois da absorção. Foi mesmo a persistência desta reação inespecífica que condicionou a aceitação de novo sôro precipitante anticabra, não absorvido com o sôro de boi, para a nossa coleção.

Em conclusão, os nossos resultados permitiram verificar que a absorção dos soros precipitantes por nós preparados provocou uma queda apreciável nos títulos homólogos dos mesmos e que, algumas vêzes, principalmente em se tratando de animais de espécies zoológicamente próximas, foi quase impossível a eliminação dos anticorpos heterólogos.

A presença em nossa coleção, de alguns soros precipitantes com pequena inespecificidade para alguns dos antígenos usados, não impede, a nosso ver, a sua utilização; pequenas diluições dos espécimes a serem examinados evitam a possibilidade de se identificar um antígeno por causa de uma reação inespecífica, se bem possamos correr o risco de, ao diluirmos o material, ultrapassarmos o título homólogo dos soros em aprêço.



Em outros casos, como por exemplo a identificação separada dos sangues de boi e cabra é impossível de ser feita com os nossos soros precipitantes. Devemos considerar ainda que, a eficiência do método será relativa, se fôr considerada a possibilidade de reações cruzadas dos nossos soros precipitantes com os soros de animais não usados na experiência.

C. *Comportamento dos soros precipitantes conservados em congelador* — Para verificar a conservação dos soros precipitantes a  $-18^{\circ}\text{C}$ , escolhemos ao acaso 5 dêles para serem dosados antes e depois de 12 meses de congelamento. Neste período ocorreram algumas variações de temperatura no interior do congelador que não condicionaram o descongelamento dos soros.

Os resultados apresentados no quadro III mostram que a permanência dos soros precipitantes, por 12 meses, no estado congelado não afetou os títulos homólogos dos mesmos. As pequenas variações que aparecem são comuns nas dosagens normais em que se procura o título pela diluição do antígeno.

QUADRO III

Títulos homólogos dos soros precipitantes mantidos por 1 ano em estado congelado

<i>Sôro precipitante</i>	<i>Título anterior</i>	<i>Título posterior</i>
Anticão .....	12.000	12.800
Antigato .....	16.000	15.000
Antigalinha .....	30.000	30.000
Anticavalo .....	20.000	15.000
Antimorcêgo .....	32.000	30.000

PARTE III — APLICAÇÃO DA REAÇÃO DE PRECIPITAÇÃO A TRIATOMÍNEOS ALIMENTADOS E CONSERVADOS EM LABORATÓRIO

Segundo alguns autores, como ELIGH<sup>7</sup> e WEST & ELIGH<sup>20</sup>, o uso do teste da precipitina na identificação de sangue ingerido por

artrópodes sofre restrições que estão ligadas a fatores vários: qualidade do sôro precipitante, quantidade do antígeno a ser examinado e grau de digestão do sangue a ser examinado que varia consideravelmente conforme a espécie do inseto que o tenha ingerido e o tempo entre a ingestão e a captura. Resultados obtidos com as mais variadas espécies de artrópodes são encontrados na literatura: GÓZONY & col.<sup>8</sup>; AMARAL & ACUIAR<sup>1</sup>; WEITZ & BUXTON<sup>19</sup>, etc. Dados referentes a triatomíneos, existem poucos: ROMAÑA<sup>13</sup>, trabalhando com ninfas de *Rhodnius prolixus*, verificou reações positivas até no 12.º dia depois do repasto sanguíneo. Com ninfas de *Triatoma infestans* nutridas em cobaia e ninfas de *R. prolixus* alimentadas em carneiro, observou resultados positivos 30 dias após a alimentação. Quanto à possibilidade da identificação separada de sangues provenientes de animais de espécies diferentes e ingeridos por um mesmo artrópode, existem também alguns dados: GÓZONY & col.<sup>8</sup>, por exemplo, fazendo sugar alternadamente em cabra e em camundongo, exemplares de *Ornithodoros moubata*, verificaram reações distintas para os dois antígenos; CORRÊA & ACUIAR<sup>4</sup>, examinando exemplares de *Triatoma infestans* colhidos no interior de habitações, verificaram reações positivas para sangue de galinha e de homem.

A coleta e conservação dos conteúdos intestinais a serem examinados é feita, quase sempre, da mesma maneira: os exemplares capturados são dissecados e o conteúdo intestinal colocado sôbre papel-filtro; na véspera da execução das provas, a parte manchada do papel é recortada e colocada em contato com solução fisiológica por tempo variável. Muitas vezes, há grande conveniência em se conservarem íntegros os artrópodes colhidos em natureza. AMARAL & ACUIAR<sup>1</sup>, trabalhando com mosquitos, verificaram que exemplares que foram sacrificados 12 horas após o repasto sanguíneo puderam ser conservados secos e íntegros por pelo menos um ano, permitindo depois disto a realização dos testes de precipitina.

Estudaremos êsses aspectos do problema no caso particular da aplicação da reação em triatomíneos alimentados e conservados no laboratório.

1. VERIFICAÇÃO DO COMPORTAMENTO DA REAÇÃO QUANDO APLICADA NA IDENTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO INTESTINAL DE "BARBEIROS" ALIMENTADOS EM UM SÓ ANIMAL

A. MATERIAL E MÉTODOS

a) *Triatomíneos usados* — Usamos ninfas de 3.º e 4.º estádios da espécie *Triatoma infestans*, criadas no laboratório e mantidas em jejum pelo menos três meses.

b) *Alimentação e pesagem dos exemplares* — Pesadas dentro de recipientes, de pêso pré-determinado, depois de alimentadas em galinhas por mais ou menos 10 minutos, foram repesadas nos seus respectivos recipientes. Assim fazendo, evitamos que a defecação espontânea dos triatomíneos, após a alimentação, contituisse causa de êrro na pesagem. As ninfas alimentadas foram distribuídas em três lotes de acôrdo com o pêso do alimento ingerido: 0 a 49 mg; 50 a 149 mg e 150 a 350 mg.

Finalmente, por sorteio, foram constituídos grupos de seis ninfas, de maneira a conter cada grupo dois elementos de cada lote.

c) *Preparação dos espécimes* — Conservados em temperatura ambiente, variando entre 16 e 29°C no período de observação, o primeiro grupo foi sacrificado 30 dias após o repasto; depois, sucessivamente, um grupo cada 15 dias, até o 10.º no 165.º dia. Os demais "barbeiros" foram sacrificados em conjunto no 180.º dia.

Os "barbeiros" foram mortos por decepção da cabeça com um corte de tesoura ao nível das inserções do primeiro par de pernas; cortávamos depois o conexivo, separávamos o revestimento dorsal do ventral e extraíamos o tubo digestivo com o seu conteúdo. Êste era triturado sôbre papel-filtro (Mn Düren 165) na superfície menor possível. Os papéis, depois de identificados com o número do triatomíneo, eram descritos com referência ao aspecto das manchas e guardados em secadores. No dia anterior à execução dos testes, as manchas eram recortadas e postas no fundo de tubos que recebiam 1,5 ml da solução fisiológica (NaCl a 0,85%). Os tubos, conservados na gela-

deira por uma noite, eram centrifugados por 10 minutos a 1.500 rpm. O sobrenadante retirado cuidadosamente com pipetas de Pasteur, era vertido sôbre o sôro precipitante no interior dos tubos de reação. As provas foram feitas pela técnica descrita na primeira parte empregando o sôro precipitante antigalinha. Com as sobras dos sobrenadantes que continham o material dos exemplares sacrificados no 180.º dia, praticamos a reação de benzidina pela técnica descrita por KOLMER<sup>9</sup>.

B. RESULTADOS E CONCLUSÕES — Apesar de uma variação acentuada no comportamento do teste, com relação ao pêso de alimento integrido e ao tempo decorrido entre alimentação e o sacrifício, pudemos verificar que a maioria dos "barbeiros" alimentados com pouco sangue, de maneira geral os dos lotes que sugaram até 149 mg, já no 45.º dia do repasto tornaram-se inadequados à aplicação da técnica. Paradoxalmente, provavelmente em virtude da grande variação individual, algumas reações positivas foram obtidas, com "barbeiros" alimentados com menos de 100 mg de sangue, no 165.º dia da refeição. Os exemplares que sugaram de 150 a 350 mg de sangue puderam ter o seu conteúdo identificado 120 dias depois da ingestão.

A tentativa que fizemos de selecionar os exemplares a serem examinados, pelo aspecto do material, pareceu-nos inútil em vista dos resultados que obtivemos. A única afirmação possível que resultou das nossas observações, é a de que os papéis manchados em vermelho, sinal evidente de sangue ainda conservado, condicionara sempre reações positivas. Entretanto, êste dado não poderá ser usado como critério de seleção porque são numerosos os espécimes que não apresentaram o sinal referido e que também condicionaram resultados positivos para a reação da precipitina.

A reação da benzidina, nos moldes em que foi realizada, praticada com a mesma finalidade, também não se mostrou útil para a seleção dos espécimes a serem examinados. Obtivemos resultados positivos para a reação da precipitina em "barbeiros" sacrificados no 180.º dia da refeição nos quais a reação da benzidina foi negativa.

Nas condições em que foi realizada a nossa observação, a técnica apresentou uma alta percentagem de eficiência nos “barbeiros” que se alimentaram com mais de 150 mg de sangue e que foram sacrificados 120 dias depois do repasto.

Não conhecemos dados na literatura a respeito da influência das condições ambientes na taxa de digestão de alimento ingerido por triatomíneos; alguns dados existem para outros insetos, como por exemplo os de WEST & ELICH<sup>20</sup> e ELICH<sup>7</sup>, que mostraram uma aceleração da digestão em temperatura acima de 30°C e um retardamento a 35°C. O último autor refere também uma aceleração da digestão quando os insetos são mantidos em ambiente muito úmido a 15°C. Supondo que a digestão dos triatomíneos deva sofrer também a influência da temperatura e da umidade, parece-nos impróprio levar as conclusões do nosso experimento para os “barbeiros” capturados em natureza. Vêm reforçar a procedência deste cuidado os achados de WEITZ & BUXTON<sup>19</sup>, mostrando que exemplares de *Glossina morsitans*, alimentados e conservados em cativeiro, puderam ter o conteúdo estomacal identificado em 95 a 100% dos casos e que os exemplares da mesma espécie, libertados e posteriormente capturados, mostraram-se apropriados ao teste em apenas 5 a 10%, três dias após a refeição.

## 2. VERIFICAÇÃO DO COMPORTAMENTO DA REAÇÃO QUANDO APLICADA NA IDENTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO INTESTINAL DE “BARBEIROS” ALIMENTADOS EM DOIS ANIMAIS

A) MATERIAL E MÉTODOS — O material e o método empregados nesta observação foram os mesmos já referidos no primeiro item desta parte; inclui-se uma segunda refeição em cão, 18 dias depois da realizada em galinha. Grupos de cinco elementos foram constituídos por sorteio, e ao acaso, foram distribuídos para o sacrifício quinzenal. Os testes foram executados pela técnica já descrita e os soros precipitantes usados, o antigalinha e o anticão já definidos anteriormente.

B) RESULTADOS E CONCLUSÕES — A maioria dos “barbeiros” sacrificados até 75 dias do primeiro repasto puderam ter o conteúdo

intestinal identificado por meio dos soros precipitantes antigalinha e anticão. Provavelmente, em se tratando de triatomíneos de outras espécies e de outros hospedeiros sugados, a possibilidade de identificação separada seja a mesma.

## 3. VERIFICAÇÃO DO COMPORTAMENTO DA REAÇÃO QUANDO APLICADA NA IDENTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO INTESTINAL DE “BARBEIROS” QUE FORAM SACRIFICADOS NO DIA DO REPASTO SANGUÍNEO E CONSERVADOS INTEGROS EM CONDIÇÕES AMBIENTES

A) MATERIAL E MÉTODOS — Os triatomíneos, depois de alimentados em galinha, foram separados em cinco lotes por ordem crescente do peso de sangue ingerido; por sorteio, retirando um elemento de cada lote, foram constituídos seis grupos de cinco elementos. Foram sacrificados no mesmo dia da alimentação em ambiente saturado de clorofórmio e conservados, no interior de tubos abertos, em condições normais de laboratório, até o dia em que deveriam ser dissecados para a feitura das provas. A preparação do material foi feita da maneira já mencionada, desde que o conteúdo intestinal se mostrasse bastante úmido para impregnar o papel-filtro; em caso contrário, o “barbeiro” era dissecado e o seu intestino triturado diretamente no tubo com solução fisiológica.

B) RESULTADOS E CONCLUSÕES — Nas condições da nossa observação, em que os “barbeiros” sugaram um mínimo de 25 mg de sangue, eles puderam ser conservados durante pelo menos três meses, sem que isto prejudicasse o uso de nenhum deles para a identificação do sangue sugado. Em vista destes resultados, é mais aconselhável que os “barbeiros” capturados em natureza sejam imediatamente sacrificados antes de serem enviados ao laboratório.

## SUMMARY

*Studies on the precipitin test applied to the identification of blood meals of triatomine bugs.*

The precipitin test in small caliber tubes was carried out with a view on identifying the blood ingested by triatomine bugs.

Tubes 40 millimeters long and 2 millimeters internal diameter were used. By capillarity these tubes were partially filled with precipitant serum and the antigen was carefully added by means of a Pasteur pipette with a long thin end. The tubes were fixed with appropriate wood holders and the results of the test were read after two hours incubation at room temperature.

The precipitant sera were prepared inoculation rabbits intramuscularly with sera from various animals previously precipitated by potassium alumen. Before use they were absorbed with heterologous antigens, aiming to improve their specificity.

The precipitin test was applied to the intestinal contents of triatomine bugs previously fed on one animal or on animals of various species, and kept in the laboratory for various months. The test was also tried with the intestinal contents of triatomines killed soon after the feeding and maintained dry in the laboratory for various months.

The following conclusions may be drawn:

The technique is simple and easy, allowing to work with small quantities of reagents and presenting satisfactory results.

Bugs that fed on one species only and having ingested from 150 to 350 mg blood gave positive tests 120 days after feeding.

Bugs that fed on two hosts of different species gave positive tests when the corresponding anti-sera were used, allowing the identification of the blood of both hosts involved.

Bugs killed and preserved dry at room temperature gave positive tests in every case up to three months after feeding.

#### REFERÊNCIAS

- 1 — AMARAL, J. P. & AGUIAR, A. A. — Reações da precipitina em alguns culicídeos. Mem. Inst. Butantan 22:205-212, 1950.
- 2 — ARNOLD, E. H.; SIMMONS, S. W. & FAWCETT, D. G. — Precipitin technique for determining mosquito blood meals. Pub. Health Rep. 61:1244-1249, 1946.
- 3 — CARROLL, G. B. & KING, W. V. — The identification of blood meal of mosquitoes by means of the precipitin test. Amer. J. Hyg. 3:491-496, 1923.
- 4 — CORRÊA, R. R. & AGUIAR, A. A. — O teste da precipitina na identificação da fonte alimentar do *Triatoma infestans*. (*Hemiptera Reduviidae*). Arq. Hig. Saúde pub. 17:3-7, 1952.
- 5 — CRUZ, F. F. — A reação das precipitinas aplicada aos dípteros do gênero *Phlebotomus*. An. Inst. Med. trop. 2:187-196, 1945.
- 6 — DOWNE, A. E. R. & MORRISON, P. E. — Identification of blood meals of blackflies (*Diptera Simuliidae*) attacking farm animals. Mosquito News 17:37-40, 1957.
- 7 — ELIGH, G. S. — Factors influencing the performance of the precipitin test in the determination of blood meals of insects. Can. J. Zool. 30:213-218, 1952.
- 8 — GÓZONY, L.; HINDLE, E. & ROSS, P. H. — Serological tests. J. Hyg. 14:354-359, 1914.
- 9 — KOLMER, J. A. — Clinical diagnosis by laboratory examinations. 2nd edition. New York, Appleton, 1949.
- 10 — MAC FARLANE, A. S. — Behavior of lipoids in human serum. Nature, London 149:439, 1942.
- 11 — PROOM, H. — The preparation of precipitating sera for the identification of animal species. J. Path. Bact. 55:419-426, 1943.
- 12 — RICE, J. B. & BARBER, M. A. — Malaria studies in Greece. A modification of the Uhlenhuth-Weidanz precipitin test for determining the source of blood meals in mosquitoes and other insects. J. Lab. & clin. Med. 20:876-883, 1934.
- 13 — ROMANA, C. — Utilisation de la méthode des précipitines pour l'identification du sang ingeré par certain reduvidés. Bull. Soc. Path. exot. 32:625-628, 1939.
- 14 — SCHUBERT, J. H. & HOLDEMAN, L. V. — A modified precipitin technique for determining the source of mosquito blood-meals. Amer. J. trop. Med. & Hyg. 5:272-273, 1956.
- 15 — SCHUBERT, J. H. & KELLEY, M. H. — The precipitin technique for determining species of host blood in mosquitoes: modifications and improvements. J. Nat. Mal. Soc. 9:341, 1950.
- 16 — WEITZ, B. — The antigenicity of sera of man and animals in relation to the preparation of specific precipitating antisera. J. Hyg., London, 50:275-294, 1952.
- 17 — WEITZ, B. — An automatic dispenser for multiple serological titrations. J. Path. Bact. 55:419-426, 1957.

- 18 — WEITZ, B. — Identification of blood meals of blood-sucking arthropods. Bull. W.H.O. 15:473-490, 1956.
- 19 — WEITZ, B. & BUXTON, P. A. — The rate of digestion of blood meals of various haematophagous arthropods as determined by the precipitin test. Bull. ent. Res. 44: 445, 1953.
- 20 — WEST, A. S. & ELIGH, G. S. — The rate of digestion of blood in mosquitoes precipitin test studies. Can. J. Zool. 30:267, 1952.
- 21 — WOLFE, H. R. — The effect of injection methods of specificity of serum precipitins. J. Immun. 29:1-12, 1935.

