

# A REFRATARIEDADE DAS AVES AO "TRYPANOSOMA (SCHIZOTRYPANUM) CRUZI"

## I. AUSÊNCIA DE PASSAGEM PARA O SANGUE; DURAÇÃO DA VIABILIDADE E DESTRUIÇÃO DOS PARASITOS NA PELE<sup>1</sup>

F. NERY-GUIMARÃES \*

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Guanabara

SUMÁRIO: Quatro frangos e três pombos (1ª e 2ª experiências) não se infectaram com o "*T. (S.) cruzi*" (amostra Y), injetados na pele com doses de  $9,8 \times 10^5$  a  $3,8 \times 10^6$  parasitos (mistura de formas de cultivo e tripomastigotos sangüíneos). Em outros 2 frangos (6ª experiência), a refratariedade não foi rompida com, respectivamente, 5 injeções peritoneais em dias alternados, de  $2,8 \times 10^6$  a  $6,1 \times 10^6$  parasitos, e 5 injeções peritoneais diárias do conteúdo de um tubo de cultivo suspenso em salina, adicionado de tripomastigotos sangüíneos, obtidos de 3 camundongos jovens infectados. E, ainda em outros 2 frangos (7ª experiência), a refratariedade não foi rompida associando-se a doses peritoneais de  $8,1 \times 10^6$  e  $3,5 \times 10^7$  parasitos, respectivamente, a ministração de dexametasona, seja com o início da droga no mesmo dia da inoculação (0,4 mg/8 doses/10 dias), seja com o início da droga 3 dias antes do dia da inoculação (0,4 mg/10 doses/12 dias). Nessas 11 aves a refratariedade foi comprovada pela inoculação do sangue em camundongos albinos recém-nascidos (total de 54 inoculações negativas em 301 camundongos); e por 52 xenodiagnósticos negativos (total de 175 larvas e adultos de *Triatoma infestans* e *Panstrongylus megistus*). As inoculações e os xenodiagnósticos foram feitos entre 1 hora (h) e 96 h e aos 10, 20 e 30 dias depois da inoculação das aves. (Quadro 1). Portanto, além da refratariedade, ficou demonstrado que os parasitos não passam para o sangue circulante das aves.

Em 10 frangos (3ª, 4ª e 5ª experiências) inoculados na pele com,  $1,9 \times 10^6$  a  $3,7 \times 10^6$  parasitos, verificou-se a duração da viabilidade dos parasitos nas áreas injetadas. Estas foram puncionadas de 1/2 em 1/2 hora, e o material obtido microscopado e inoculado em camundongos recém-nascidos. De 17 inoculações feitas até às 8:30 h, doze foram positivas, inclusive a última; e de 13 inoculações feitas entre 9 e 90 h (as 4 primeiras ainda de 1/2 em 1/2 h), todas foram negativas. Por outro lado, de 10 xenodiagnósticos feitos nas áreas injetadas, entre 1/2 h e 9 h após a inoculação das aves, apenas 2 foram positivos; e de 10 xenodiagnósticos feitos entre 9 e 90 h, todos foram negativos. (Quadro 2).

1 Recebido para publicação a 23-9-71.

\* Professor do Instituto Oswaldo Cruz; Chefe de Pesquisas do Conselho Nacional de Pesquisas; Membro do Quadro de Peritos da Organização Mundial de Saúde.

Em 4 frangos (8ª experiência), 10 xenodiagnósticos foram feitos entre 1 e 10 h, sendo 2 positivos (7 h e 8 h). Apesar de dificuldades operacionais na execução dos xenodiagnósticos, nas condições experimentais deste trabalho, eles se mostraram inferiores às inoculações em camundongos recém-nascidos, como prova diagnóstica laboratorial. Portanto, verificou-se que ainda são encontrados parasitos viáveis nas áreas injetadas, pelo menos até às 8:30 h depois da inoculação.

Todavia, a partir de 2 h após a inoculação os parasitos diminuem de número progressivamente nas áreas injetadas, ao mesmo tempo que mostram sensíveis alterações morfológicas, encontrando-se também muitos deles mortos. Ao exame direto, não mais foram vistos depois das 5:30 h.

As inoculações provocam na pele dos frangos um quadro inflamatório que envolve o tecido adiposo e os músculos, indo até à formação de abscessos. Um processo de fagocitose é patente entre 6 e 20 h depois da inoculação; e essa fagocitose é exercida principalmente pelos heterófilos. Às custas dos resíduos celulares e parasitários, o processo inflamatório se prolonga pelo menos até às 44 h. Às 76 h ainda foram vistos focos de células redondas peri-vasculares; mas, às 90 h só foram vistas reações cicatriciais fibro-colágenas.

Como nas primeiras horas não foi observada fagocitose, e como foram vistos parasitos livres alterados e mortos, e cada vez em menor número, é provável que a destruição na pele decorra inicialmente da ação de fatores líticos oriundos do sangue. É provável também, que a maioria dos parasitos incluídos pelos heterófilos já estejam mortos. Se parasitos viáveis são fagocitados, eles são sistematicamente destruídos. Isto é, o oposto do que acontece nos animais suscetíveis, nos quais os parasitos englobados, principalmente pelos histiócitos, passam a se dividir ativamente até à formação de pseudocistos.

A refratariedade das aves ao "*T. (S.) cruzi*" foi um fato que se impôs naturalmente, e logo se passou a explorar o seu lado prático, isto é, garantir a "limpeza" das criações de triatomíneos para o xenodiagnóstico, alimentando-os em aves (Brumpt, 1914). Em 1944, Dias comprovou essa refratariedade e refere que "Nas escassas referências que se encontram na literatura... o controle dos resultados negativos é quase sempre precário, não permitindo excluir a possibilidade de uma infecção inaparente". Nós nada mais encontramos nos levantamentos bibliográficos sobre doença de Chagas do IBBD (1958 e 1959) e nem nas publicações de referência de 1960 a 1970.

Este trabalho apresenta os primeiros resultados de estudos sobre a refratariedade das aves ao "*T. (S.) cruzi*", os quais tiveram os seguintes objeti-

vos: verificar se os parasitos passavam para o sangue circulante das aves; tentar romper a refratariedade pela injeção de doses maciças repetidas e pela associação destas com a administração de corticosteróide; determinar o tempo de viabilidade dos parasitos nas áreas cutâneas injetadas; e, finalmente, pesquisar os processos que atuam na eliminação dos parasitos.

## MATERIAL E MÉTODOS

*Aves.* Foram usados nas experiências (exp.) frangos Leghorn de 20 a 60 dias e pombos adultos (*Columba livia*). Estes só foram utilizados uma vez por causa da infecção natural por "*Haemoproteus*".

*Inóculos:* 0,5 ml de uma mistura de formas de cultivo e de tripomastigotos metabólicos de "*T. (S.) cruzi*" (amostra Y). As culturas em meio de NNN (repiques de 8-10 dias) foram lavadas por centrifugação (3.000 rpm-10') e suspensas em salina; e



os tripomastigotos foram obtidos de camundongos albinos infectados (sangue heparinado de punção cardíaca, lavado com salina 3 vezes a 500 rpm<sup>2</sup>). Com hemocítômetro foi calculado o número aproximado de parasitos.

**Inoculação das aves.** Foram feitas simultaneamente 3 injeções de 0,5 ml em cada ave na pele sobre os músculos peitorais (duas de um lado, distantes entre si 5 cm, e uma do outro lado). Os pontos de inoculação foram imediatamente circundados por traços de corantes; e as aves foram identificadas como A, B, C, etc., precedidos do número da exp. (1A, 1B, 1C, etc.; 2A, 2B, etc.; 3A, 3B, etc.). Nas 6.<sup>a</sup> e 7.<sup>a</sup> exp. a inoculação foi peritoneal e os inóculos variaram de 1 a 4 ml.

O término da 3.<sup>a</sup>, 4.<sup>a</sup>, 5.<sup>a</sup> e 8.<sup>a</sup> exp. foi aos 10 dias depois da inoculação; e o da 1.<sup>a</sup>, 2.<sup>a</sup>, 6.<sup>a</sup> e 7.<sup>a</sup> exp. aos 30 dias, quando as aves foram sacrificadas e conservados em formalina a 10% pedaços de coração, fígado e baço. (Total de 31 blocos).

As biópsias das áreas injetadas (trinta), depois de feitas as impressões em lâminas, foram estiradas em rodela de cortiça, e também fixadas em formalina a 10%. As inclusões foram feitas em parafina, sendo obtidos cortes de 6 micra, corados pelos métodos de hematoxilina-eosina (H-E) e Giemsa. O exame a fresco do material das punções (obtido com seringa tipo "tuberculina") foi feito com objetiva 40 $\times$ . Os preparados de material das punções (sessenta) e das impressões (sessenta), foram corados pelos métodos de Giemsa e Brachet.

O sangue das aves para inoculação em camundongos foi obtido da veia da asa ou do pescoço. Os camundongos usados nas inoculações (peritônio), tanto de sangue como de material das punções das áreas injetadas (em grupos de 5-6), eram albinos e recém-nacidos, e tiveram o seu sangue examinado 6-8 vezes, entre o 5.<sup>o</sup> e o 25.<sup>o</sup> dia depois da inoculação. As inoculações de sangue foram em número de 54, totalizando 301 camundongos (dos quais 21 morreram de intercorrência). As inoculações de material obtido pelas punções fo-

ram em número de 30, totalizando 170 camundongos (dos quais 8 morreram de intercorrência). Nos grupos de camundongos referidos como positivos na 3.<sup>a</sup>, 4.<sup>a</sup> e 5.<sup>a</sup> exp., foram vistos tripanosomas no sangue de um, de mais de um ou de todos. Os xenodiagnósticos (xenos) foram feitos com larvas (4.<sup>o</sup> e 5.<sup>o</sup> estádios) e adultos de *Triatoma infestans* e *Panstrongylus megistus* (2 a 4 exemplares em cada xeno). Os xenos realizados longe das áreas injetadas (coxas) foram em número de 52, totalizando 175 triatomíneos; e os xenos feitos diretamente nas áreas injetadas, foram em número de 30, totalizando 105 triatomíneos. Desses 280 insetos, 24 morreram antes da leitura (30-40 dias).

## RESULTADOS

(As experiências foram realizadas de janeiro a agosto de 1971).

### A — Refratariedade e tentativas de demonstração de tripomastigotos no sangue circulante das aves.

1.<sup>a</sup> exp. (4 frangos).  $9,9 \times 10^5$  parasitos. 2.<sup>a</sup> exp. (3 pombos).  $3,3 \times 10^6$  parasitos.

Após a inoculação das aves, na 1.<sup>a</sup> exp., nos períodos de 1, 2 e 4 horas (h) (ave 1A), 6, 8 e 10 h (ave 1B), 14, 22 e 31 h (ave 1C), 45, 72 e 96 h (ave 1D), e aos 10, 20 e 30 dias (todas as aves); e na 2.<sup>a</sup> exp., nos períodos de 1, 3 e 7 h (ave 2A), 12, 18 e 25 h (ave 2B), 33, 44 e 51 h (ave 2C) e aos 10, 20 e 30 dias (todas as aves), foram feitos: 1) *Inoculação* do sangue das aves em camundongos; 2) *Xenos* longe das áreas injetadas. *Resultados:* Negativos. Também foi negativo o exame dos cortes das vísceras das aves sacrificadas, quanto à pesquisa de amastigotos tissulares.

**B — Tentativas para romper a refratariedade.**

*a. Doses maciças repetidas.*

Na 6.<sup>a</sup> exp., um frango foi injetado 5 vezes no peritônio, em dias alternados, com respectivamente,  $3,4 \times 10^6$ ,  $5,7 \times 10^6$ ,  $2,8 \times 10^6$ ,  $9,4 \times 10^6$  e  $2,9 \times 10^6$  parasitos. Outro frango recebeu no peritônio, em 5 dias consecutivos, doses representadas pelos parasitos de um tubo de cultivo, suspensos em salina (3 ml), adicionados de suspensão de tripomastigotos retirados de 3 camundongos jovens (1 ml). Inoculações de sangue dessas aves em camundongos e xenos, foram feitas aos 10, 20 e 30 dias depois da inoculação das aves. *Resultados.* Negativos. Também foi negativa a pesquisa de amastigotos tissulares nas vísceras das aves.

*b. Doses maciças associadas à corticosteróide.*

Na 7.<sup>a</sup> exp. foram usados frangos de 100-180 g. Dois foram injetados no peritônio com  $8,1 \times 10^6$  e  $3,5 \times 10^6$  parasitos, respectivamente, e a partir do mesmo dia da inoculação, passaram a receber dexametasona\* (0,4 mg/8 doses/10 dias). Um dos frangos morreu após a 3.<sup>a</sup> dose da droga, e o outro recebeu as 8 doses, morrendo aos 15 dias da inoculação. Neste último, foi feito xeno e inoculação do seu sangue em camundongo aos 10 dias. Um terceiro frango recebeu a dexametasona (0,4 mg/10 doses/12 dias) com início 2 dias antes do dia da inoculação (peritônio) de  $3,5 \times 10^7$  parasitos. Xenos e inoculações do san-

gue da ave em camundongos foram feitos aos 10, 20 e 30 dias depois da inoculação do *T. cruzi*. *Resultados.* Negativos. O exame dos cortes das vísceras também foi negativo.

**C — Duração da permanência de parasitos viáveis nas áreas injetadas.**

3.<sup>a</sup> exp. (4 frangos),  $1,8 \times 10^6$  parasitos. 4.<sup>a</sup> exp. (3 frangos),  $2,4 \times 10^6$  parasitos. 5.<sup>a</sup> exp. (3 frangos),  $3,6 \times 10^6$  parasitos.

Após a inoculação das aves, na 3.<sup>a</sup> exp., nos períodos de 1/2, 1 e 1 1/2 h (ave 3A), 2, 2 1/2 e 3 h (ave 3B), 3 1/2, 4 e 4 1/2 h (ave 3C), 12, 16 e 20 h (ave 3D); na 4.<sup>a</sup> exp., nos períodos de 5, 5 1/2 e 6 h (ave 4A), 6 1/2, 7 e 7 1/2 h (ave 4B), 24, 28 e 32 h (ave 4C); e na 5.<sup>a</sup> exp., nos períodos de 8, 8 1/2 e 9 h (ave 5A), 9 1/2, 10 e 10 1/2 h (ave 5B) e 44, 76 e 90 h (ave 5C), foram feitos: 1) *Punções* das áreas injetadas para: a) *Exame direto* a fresco e após coloração; b) *Inoculações* em camundongos. 2) *Xenos* nas áreas injetadas (Ver adiante). 3) *Biópsias* das áreas injetadas, para preparados por impressão e cortes.

*Resultados:* Pelo exame direto verificou-se que até às 4 1/2 h ainda foram encontrados parasitos móveis, ao lado de muitos alterados e mortos; e as inoculações em camundongos foram positivas após um período pré-patente (PPP) de 10-12 dias. Às 5 e 5 1/2 h ainda foram vistos raros parasitos alterados e mortos; e daí por diante eles não foram mais visualizados. Entretanto, ainda havia parasitos vivos, uma vez que as inoculações entre

\* "Decadron" (R) (9-alfa-fluor-16-alfa-metil-prednisolona). Sharpe & Dohme.



5 e 8 1/2 h foram positivas, embora com um PPP muito prolongado (16-22 dias). Das 17 inoculações feitas entre 1/2 h e 8 1/2 h, cinco foram negativas (3, 4 1/2, 5 1/2, 6 e 8 h). Todas as inoculações feitas depois de 8 1/2 h (treze) foram negativas; do mesmo modo que todos os xenos feitos depois de 9 h (dez).

Os xenos foram realizados, aproximadamente, de 50 em 50 minutos. Entre 1/2 h e 9 h foram feitos 10 xenos, dos quais apenas 2 foram positivos (2 h e 3 h e 40'). Essa baixa positividade foi atribuída à possibilidade dos insetos sugarem fora das áreas injetadas. (Os tubos de inseto têm um diâmetro de 3 cm e calculou-se o diâmetro das áreas injetadas em, aproximadamente, 1,5 cm).

Realizou-se, então, a 8.<sup>a</sup> exp., exclusivamente para a observação dos xenos. Foram usados 4 frangos, inoculados com  $6,9 \times 10^6$  parasitos. Entre 1 h e 10 h após a inoculação das aves, foram feitos 10 xenos (empregando tubos de hemólise, os insetos tendo sido postos para sugar, um de cada vez). *Resultados.* apenas 2 xenos foram positivos (7 h e 8 h). Embora se tivesse confirmado a baixa positividade dos xenos (20%) em relação às inoculações em camundongos (70%), assim como a viabilidade dos parasitos até às 8 h, esta experiência sugeriu que deve ser difícil a retirada dos parasitos pela probóscida dos insetos.

#### D — Provável natureza dos processos que atuam na eliminação dos parasitos.

O exame dos cortes e impressões mostrou um quadro inflamatório que, em suas linhas gerais, não se afasta

dos padrões clássicos, sendo todavia um tanto rápido. Pode ser acompanhada a diapedese, primeiramente dos granulócitos heterófilos, que nas aves são pseudo-eosinófilos (*Taliaferro & Bloom, 1945*). Eles são cada vez em maior número, ocorrendo a formação de microabscessos. O processo necrótico se estende no tecido subcutâneo, envolvendo o tecido adiposo e os músculos, que se mostram degenerados. Só depois de 3-4 h é que se torna conspícua a presença de agranulócitos (linfócitos, plasmócitos, histiócitos). Daí por diante, os mononucleares aumentam de número. Nas impressões coradas pelo Brachet, verifica-se que o citoplasma de alguns desses agranulócitos fixa intensamente a pironina. Depois das 6 h é reconhecível o processo fagocitário, o qual se intensifica progressivamente, sendo notável a participação dos heterófilos, que englobam parasitos, resíduos celulares e até células inteiras (linfócitos). O papel dos histiócitos na fagocitose dos parasitos, é secundário. Ocasionalmente, são vistos pequenos acúmulos de hemácias nucleadas, provenientes do inóculo, os quais são fagocitados pelos histiócitos. Depois das 20 h o processo inflamatório prossegue a sua marcha pelo menos até às 44 h, à custa dos resíduos celulares e parasitários. Nesse período ainda são encontrados pequenos focos necróticos. Porém, às 76 h só restam focos residuais, representados por acúmulos de células redondas perivasculares, sendo notável a presença de fibroblastos, resultantes da transformação dos histiócitos. As 90 h só foram vistas reações cicatriciais fibrocolágenas.

O estudo do material das punções mostrou que a destruição dos parasitos ocorre nas próprias áreas inoculadas. Na primeira hora eles são muito numerosos, extremamente móveis e livres, com óbvia predominância de epimastigotos. Mas, a partir de 2 h, nota-se que o número de parasitos diminui acentuadamente, ao mesmo tempo que mostram sinais de alterações, e estando muitos mortos. A coloração pelo verde de metila-pironina mostra muitos parasitos livres, já alterados, com o citoplasma róseo pálido e vacuolar, sem flagelo, estando o núcleo e principalmente o cinetoplasto, aparentemente íntegros. Depois das 6 h, aproximadamente, começam a ser vistos parasitos incluídos principalmente em heterófilos, sendo os seus contornos mal definidos. O ápice da fagocitose parece ocorrer entre 10 e 20 h, porém, desde às 14-16 h, praticamente todos os parasitos incluídos já estão alterados, sendo apenas reconhecíveis pelo núcleo picnótico, e pelo cinetoplasto, que é a estrutura mais resistente.

### Discussão

A refratariedade das aves ao "*T. (S) cruzi*", nas condições experimentais aqui relatadas, não foi rompida, nem pelas doses maciças repetidas e nem por estas associadas à corticosteróide (dexametasona). Quadro 1. Por outro lado, ficou plenamente demonstrado que os parasitos não passam para o sangue circulante das aves. Calculando-se em 50 ml, em média, o total de sangue das aves, e considerando que o grupo de triatomíneos de cada xenos, retire, em média, 1 ml de sangue (ou seja 1/50), isto corresponderia a

xenos humanos com 150 triatomíneos, cifra que deverá ser multiplicada por 6, que foi o número de xenos em cada ave. E, do mesmo modo, calculando-se em 0,5 ml a quantidade de sangue das aves em cada inoculação (ou seja 1/100 do total, multiplicado por 6,) isto no caso de um homem adulto, corresponderia a 6 inoculações de 50 ml de sangue, ou seja uma sangria de 300 ml.

Ainda são encontrados parasitos viáveis nas áreas injetadas até às 8 1/2 h depois da inoculação. Quadro 2. Para a demonstração dos parasitos nas áreas injetadas, a positividade dos xenos (20%) foi muito menor que a das inoculações (70%). Além de dificuldades operacionais na execução dos xenos, parece que é difícil a retirada dos parasitos pela probóscida dos insetos, a julgar pelo número de provas negativas (16 em 20). Dos 4 xenos positivos, dois correspondem às primeiras horas (2 h e 3 h e 40 minutos) e 2 correspondem praticamente ao tempo limite de viabilidade dos parasitos (7 h e 8 h). Este fato, afasta a hipótese de que, no organismo das aves, os parasitos sofram alterações que interfiram com a sua evolução nos triatomíneos. Por outro lado, o PPP nos camundongos inoculados com material das punções de 1/2 h a 4 1/2 h (10-12 dias), foi muito menor que o PPP nos camundongos inoculados com material de 5 a 8 1/2 h (16-22 dias). Isto foi devido, provavelmente, ao fato de que as inoculações feitas depois das 5 h, continham menor número de parasitos. Com efeito, *Romaña & Terracini* (1945) verificaram que a duração do PPP estaria diretamente relacionada com o



número de parasitos injetados. Entretanto, é possível que estes tenham sofrido alterações, por mais tempo no organismo das galinhas.

Foi encontrado, em linhas gerais, um quadro inflamatório com formação de abscessos, espraiando-se no tecido subcutâneo e envolvendo músculos e tecido adiposo. Um processo de fagocitose de células e parasitos intensificou-se depois das 6 h após a inoculação das aves, prolongando-se até às 24 h. O processo inflamatório se prolonga até às 76 h, à custa dos resíduos celulares e parasitários; e às 90 h só foram vistas reações fibrocolágenas. Este processo inflamatório foi relativamente rápido, o que esta-

ria de acordo com as observações de *Taliaferro & Bloom* (1945), os quais concluem que a inflamação em aves, por exemplo, é mais rápida que em roedores.

Verifica-se a diminuição progressiva dos parasitos, já desde às 2 h após a inoculação, sendo visualizados muitos alterados e muitos mortos. Como nas primeiras horas não foi observada fagocitose, é provável que a destruição dos parasitos decorra preliminarmente da ação de fatores líticos oriundos da corrente circulatória, juntamente com as células da inflamação. O papel dos agranulócitos na fagocitose é secundário. É provável também que muitos parasitos inclui-

## QUADRO 1

Negatividade da inoculação do "*T. (S.) cruzi*" em frangos e pombos com doses elevadas de formas de cultivo + tripomastigotos metabólicos, inclusive em associação com corticosteróide. Provas realizadas entre 1 h e 90 h e aos 10, 20 e 30 dias depois da inoculação.

Provas negativas	Experiências				Totais
	1. <sup>a</sup> 4 frangos	2. <sup>a</sup> 3 pombos	6. <sup>a</sup> 2 frangos	7. <sup>a</sup> 2 frangos	N. <sup>o</sup> de provas / N. <sup>o</sup> de animais
Inoculações do sangue das aves em camundongos	24/138	18/98	6/32	6/33	54/301*
N. <sup>o</sup> de provas/N. <sup>o</sup> de camundongos					
Menodiagnósticos longe das áreas de inoculação	23/77	17/56	6/20	6/22	52/175*
N. <sup>o</sup> de provas/N. <sup>o</sup> de insetos					

(\*) Vinte camundongos e 18 triatomíneos morreram antes de examinados.

## QUADRO 2

Viabilidade do "*T. (S.) cruzi*" na pele de frangos inoculados com formas de cultivo + tripomastigotos metabólicos.  
Provas realizadas entre 1/2 h e 90 h depois da inoculação das aves

Provas nas áreas injetadas	Resultados das experiências							Totais
	3. <sup>a</sup>		4. <sup>a</sup>		5. <sup>a</sup>		8. <sup>a</sup>	N.º de provas
	1/2 a 4 1/2 h	12-16- 20 h	5 a 7 1/2 h	24-28- 32 h	8 a 10 1/2 h	44-76- 90 h	1/2 a 9 h	N.º de animais
	3A-3B- 3C	3D	4A-4B	4C	5A-5B	5C	8A-8B- 8C-8D	
Punções e inoculações do material em camundongos	9/49	3/18	6/34	3/16	6/35	3/18	—	30/170*
N.º de provas/N.º de camundongos	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos*	Neg		
Xenodiagnósticos	5/11	3/12	3/12	3/11	3/12	3/11	10/28	30/105*
N.º de provas/N.º de insetos	Pos**	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos***	

Pos = positivo. Neg = negativo. (\*) Oito camundongos e 10 triatomíneos morreram antes de examinados.

(\*\*) Positivos somente 2 vezes no período (2 h e 3 h e 40').

(\*\*\*) Positivos somente 2 vezes no período (7 h e 8 h).



dos pelos heterófilos, já estejam mortos. Porém, se parasitos viáveis são englobados pelos heterófilos e sofrem transformação para amastigotos, do mesmo modo como acontece dentro dos histiócitos nos animais sensíveis, enquanto nestes, os parasitos passam a sofrer divisões binárias sucessivas até à formação de pseudocistos, nos heterófilos eles são sistematicamente destruídos.

Portanto, a eliminação dos parasitos ocorre na própria pele. E, para a sua eliminação concorre, provavelmente, a ação de substâncias líticas transudadas dos vasos sanguíneos, secundada pela fagocitose, cujo maior papel cabe aos heterófilos.

#### RESUMÉ

Résistance des oiseaux à l'infection par le "*Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*" I. Absence de passage des parasites pour le sang; durée de la viabilité et destruction des parasites dans les points d'inoculation.

Quatre poulets et 3 pigeons (1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> expériences) ne se sont pas infectés avec le "*T. (S.) cruzi*" (souche Y) injectés sous la peau avec des doses d'environ  $9,8 \times 10^5$  à  $3,8 \times 10^6$  parasites (formes de cultures et formes sanguines). Deux autres poulets (6<sup>ème</sup> exp.) se sont montrés réfractaires respectivement à 5 injections dans le péritoine, en jours alternés, de  $2,8 \times 10^6$  à  $6,1 \times 10^6$  parasites et 5 injections dans le péritoine, quotidiennes, du contenu d'un tube de culture, en suspension saline, additionées de formes sanguines obtenues de 3 jeunes souris infectés. Deux autres poulets (7<sup>ème</sup> exp.) se sont encore montrés réfractaires en associant, aux doses

dans le péritoine, de  $8,1 \times 10^6$  et  $3,5 \times 10^7$ , respectivement, l'administration de dexaméthasone: soit que l'on commence la drogue le même jour de l'inoculation (0,4 mg/8 doses/10 jours), soit que l'on commence 3 jours avant celui de l'inoculation (0,4 mg/10 doses/12 jours).

On a constaté que ces 11 oiseaux étaient réfractaires par l'inoculation de sang chez les souris albinos nouvelles-nées (un total de 54 inoculations négatives chez 301 souris) et par 52 xenodiagnostiques négatifs (un total de 175 larves et adultes de *Triatoma infestans* et *Panstrongylus megistus*). Les inoculations et les xenodiagnostiques ont été réalisés entre 1 h et 96 heures et aux 10, 20 e 30 jours après l'inoculation des oiseaux. Tableau 1. Donc on a démontré que non seulement les oiseaux sont réfractaires, mais aussi que les parasites ne passaient pas dans le sang circulant des oiseaux.

Chez 10 poulets (3<sup>ème</sup>, 4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> exp.) inoculés sous la peau avec environ  $1,9 \times 10^6$  à  $3,7 \times 10^6$  parasites, on a observé la durée de la viabilité des parasites dans les points injectés. On a fait la ponction de ceux-ci toutes les demi-heures et le matériel obtenu a été inoculé chez des souris nouvelles-nées. Sur 17 inoculations réalisées jusqu'à 8½ heures, 12 ont été positives, la dernière inclus; et sur 13 inoculations réalisées entre 9 et 90 heures (les quatre premières de 1/2 en 1/2 heure) toutes ont été négatives. Par contre sur 10 xenodiagnostiques réalisés dans les points injectés, entre une demi-heure et 9 heures après l'inoculation des oiseaux, 2 seulement ont été positifs et sur 10 xe-

nodiagnostiques réalisés entre 9 et 90 heures, tous ont été négatifs. Tableau 2. Par la répétition de 10 xenodiagnostiques (8<sup>ème</sup> exp.) sur 4 nouveaux poulets, entre 1 et 10 heures, seulement 2 ont été positifs (7 et 8 heures).

Malgré les difficultés opérationnelles dans l'exécution des xenodiagnostiques, dans les conditions expérimentales de ce travail, ils ont été inférieurs aux inoculations chez les souris nouvelles-nées, comme preuve diagnostique de laboratoire.

On a cependant, observé qu'il y avait encore des parasites viables dans les points injectés, tout au moins jusqu'à 8½ heures après l'inoculation. Néanmoins, à partir de 2 heures le nombre de parasites diminue progressivement dans les points injectés, ceux-ci présentent simultanément des altérations morphologiques sensibles; et il y en a aussi beaucoup de morts.

A la suite d'un examen direct, on a observé que les parasites avaient disparus après 5 heures et demie.

Les inoculations provoquent dans la peau des poulets un procès inflammatoire qui entoure le tissu adipeux et les muscles allant jusqu'à la formation d'abcès. Un procès de phagocytose est évident entre 6 h et 10 heures après l'inoculation et cette phagocytose est exercée principalement par les hétérophiles. Aux dépens du résidu cellulaire et parasitaire, le procès inflammatoire se prolonge jusqu'à 44 heures. On a encore observé des foyers de cellules rondes périvasculaires après 76 heures; mais vers les 90 heures on a observé seulement des réactions de cicatrisation fibro-colagènes.

Comme la phagocytose n'a pas été constaté aux premières heures, et comme on a constaté la présence de parasites altérés ainsi que d'autres morts, et chaque fois en plus petit nombre, il est probable que leur destruction dans la peau provient d'abord de l'action des facteurs litiques provenant du sang. De plus, il est probable que beaucoup de parasites inclus par les hétérophiles soient déjà morts. Si les parasites viables sont inclus par les phagocytes, ils sont systématiquement détruits. C'est le contraire de ce qui se passe avec les animaux susceptibles, chez qui les parasites englobés principalement par les histiocytes, se divisent activement jusqu'à la formation de pseudocystes.

#### SUMMARY

The Refractory State of Birds Toward the "*Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*". I. Lack of transfer of parasites to the blood. Duration of viability and destruction of the parasites in the skin.

In experiments number one and two, four chickens and three pigeons were not infected when subjected to skin inoculations containing parasites doses of  $9.9 \times 10^5$  and  $3.8 \times 10^6$  both from culture plus blood borne forms. In experiment number 6 the refractory state was not broken when two other chickens received every other day 5 intraperitoneal injections of  $2.8 \times 10^6$  to  $6.1 \times 10^6$  parasites or 5 intraperitoneal injections daily of the parasites from a culture tube suspended in saline plus blood borne forms from 3 infected young mice. The refractory state was not broken also in two



chickens from experiment number 7, where dexamethasone was associated to the intraperitoneal parasites doses of  $8.1 \times 10^6$  and  $3.5 \times 10^7$ , respectively. This drug was administered either on the first day (0.4 mg/8 doses/10 days) or three days prior to the inoculation (0.4 mg/10 doses/12 days).

In these 11 birds the refractory state was proven following blood inoculation to newborn albino mice (54 negative inoculations in 301 mice), 52 negative xenodiagnosis tests (175 larvae and adults from *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus*). The inoculations and the xenodiagnosis were performed between 1 and 96 hours and on the 10<sup>th</sup>, 20<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> days after the bird were inoculated. Therefore, besides the refractory condition it was also shown that the parasites do not enter the peripheral blood. Table 1.

In the experiments number 3, 4 and 5, a total of 10 chickens were inoculated in the skin with  $1.8 \times 10^6$  to  $3.6 \times 10^6$  parasites and viable forms were found in the site. In these areas punctions were made every half-an-hour and the harvested material inoculated into newborn mice. From 17 inoculations performed within 8½ hours, 12 were positive, including the last one; and from 13 performed between 9 and 90 hours (the first four still made every half-and-hour), all were negative. On the other hand, from 10 xenodiagnosis made in the sites of inoculation between half-an-hour and 9 hours after inoculation, two were positive; and all xenodiagnosis performed between 9 and 90 hours were negative. When 10 xeno-

diagnosis were repeated in 4 new chickens (experiment number 8) between half-an-hour and 10 hours only 2 were positive (7 and 8 hours). Table 2.

The xenodiagnosis under the experimental conditions of this work, as a laboratory diagnostic test, was inferior to the newborn mice inoculation.

Then viable parasites were still present in the inoculated areas at least 8½ hours after inoculation. However, the number of parasites decreased progressively in the inoculated areas, 2 hours after inoculation, showing at the same time clear morphological alterations as well as many dead forms. Under direct examination none was seen after 5½ hours of inoculation.

The inoculation cause an inflammatory picture of chicken skin that involves both the adipose tissue and muscles leading to abscesses formation. Phagocytosis which is chiefly produced by heterophil leucocytes takes place between 6 and 20 hours after inoculation. This inflammatory picture last at least 44 hours after inoculation due to cellular and parasites debris. Seventy-six hours after inoculation foci of rounded peri-vascular cells were still seen, but after 90 hours only residual fiber-collagenous reaction was present.

As phagocytosis was not observed during the first hours, and since altered and dead parasites and in decreasing numbers were seen, it is probable that their destruction in the skin be due to the action of lytic factors coming from the blood. It is also probable that the parasites engulfed by the heterophil leucocytes might be dead. If viable parasites are engulf-

phed they are systematically destroyed. This is opposite to what happens in the susceptible animals in which the parasites when engulfed chiefly by the histiocytes multiply actively up to the development of pseudocysts.

### AGRADECIMENTOS

À Dra. Alina Perlowagora Szumlewicz pelo fornecimento dos triatomíneos, e aos Técnicos de Laboratório, Benedito Labre, Claudionor Goulart e Geraldo Praxedes, pelo auxílio prestado durante a execução deste trabalho.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRUMPT, E. (1914) — Le Xenodiagnostic. Application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier à la Trypanosomose de Chagas. "*Bull. Soc. Path. Exot.*", 7:706.
- DIAS, E. (1944) — Não receptividade do pombo doméstico à infecção por *Schizotrypanum*, "*Mem. Inst. Oswaldo Cruz*", 40:191.
- "DOENÇA DE CHAGAS—BIBLIOGRAFIA BRASILEIRA" (1958) "Inst. Bras. Bibliog. Document." Conselho Nacional de Pesquisas.
- "DOENÇA DE CHAGAS—BIBLIOGRAFIA" (1959) *Idem.*
- TALIAFERRO, W. H. & BLOOM, W. (1945) — Inflammatory Reactions in the Skin of Normal and Immune Canaries and Monkeys after the Local Injection of Malarial Blood. "*J. Inf. Dis.*", 77:109.
- ROMAÑA, C. & TERRACINI, E. (1945) Comportamiento de las infecciones de lauchas por *S. cruzi*, segun la concentración de parásitos inoculados (infecciones crónicas iniciales). — "*Ann. Inst. Med. Reg. Tucuman, Argentina*, 1:141.