

# **Didelphis marsupialis, Linnaeus 1758, su importancia como reservorio del Trypanosoma cruzi en la región de Zipayare (Edo. Zulia-Venezuela)\***

Susana Tarazón Gil de Soto

Médico Cirujano

## **INTRODUCCION**

Comprobada por medio del Xenodiagnóstico y la serología, la existencia de la enfermedad de Chagas en la región de Zipayare (Edo. Zulia-Venezuela), iniciamos el estudio sobre la epidemiología de esta endemia, con la captura de animales silvestres, a fin de establecer los posibles reservorios de la enfermedad.

Dado el predominio de los Didelphideos (rabipelados) en la fauna silvestre de la región, quisimos en primer lugar determi-

\* Tesis presentada ante la Ilustre Universidad del Zulia, para optar al Título de Doctor en Ciencias Médicas. Mcbo. Vzla. 1970.

nar la importancia de estos marsupiales como reservorios del **Trypanosoma cruzi**, siendo este el motivo del presente trabajo.

Según describe Pons<sup>1</sup>, Zipayare es una extensa región situada en el Municipio Valmore Rodríguez del Distrito Bolívar, Edo. Zulia, al norte de la carretera Lara-Zulia, entre los paralelos 10° y 10°20' al norte del ecuador y meridiano 71, es decir, en pleno trópico. Desde el punto de vista geográfico comprende dos zonas: una formada por la sabana y la otra selvática. La sabana es de tipo tropófilo y existen zonas arboradas, inarboradas y con matas o islotes de árboles. La selva es de tipo tropical macrotérmica, se extiende desde la sabana hasta la serranía Lara-Zulia, su terreno es quebrado y de pobre capa vegetal y cubre un valle por el cual corren los ríos Machango y La Pedregosa.

En esta región se encuentra un Asentamiento Campesino del Instituto Agrario Nacional que comprende un área aproximada de 10.000 hectáreas divididas en 488 parcelas de 20 hectáreas cada una y limitada al norte por el cerro La Aguja, al sur por la Cordillera Lara-Zulia, al este por el Cerro Ancho de la Cordillera Lara-Zulia (ramal andino) y al oeste con la carretera de Zipayare. Hasta 1963 habían sido asentados 386 parceleros que se dedicaban a la explotación agropecuaria y la población era de 2.000 habitantes aproximadamente. Además existen casas y ranchos dispersos por la sabana.

En su descripción inicial, Chagas<sup>2</sup> considera la enfermedad como una zoonosis y resalta la gran importancia epidemiológica de los reservorios y vectores silvestres del **Trypanosoma cruzi**, exponiendo que sería de gran importancia "la posibilidad de adaptación, con acción patógena, de un parásito de animales silvestres al organismo humano y viceversa".

Todo parece indicar que la tripanosomiasis americana era, en un principio, una enzootia adaptada exclusivamente a animales silvestres y transmitida por triatominos de hábitos silvestres. En algunas áreas del continente, esta situación aún persiste, pero en la mayoría de los países, el parásito ha sido transportado a nidos artificiales infectando al hombre y animales domésticos susceptibles (perros y gatos) y transmitida por triatominos de hábitos domiciliarios.

Barretto<sup>3</sup> considera que los focos naturales de la enfermedad de Chagas son unidades ecológicas integradas por nidos más o menos bien definidos, constituidos por mamíferos silvestres que albergan el **Trypanosoma cruzi** y que sirven de fuente de infección para triatomíneos silvestres, los cuales a su vez transmiten el parásito a otros animales silvestres; de esta forma se asegura la transmisión continua y regular; esta situación puede perdurar indefinidamente, sin depender de la presencia del hombre mientras no se rompa el balance ecológico.

Dada la gran susceptibilidad del hombre y animales domésticos y la abundante proliferación de triatomíneos de hábitos domiciliarios, la infección humana se diseminó y el ciclo doméstico del parásito pasó a adquirir gran importancia ya que una vez establecido, los animales silvestres dejan de constituir elementos de gran importancia en la cadena epidemiológica, por lo que la enfermedad de Chagas es considerada hoy en día como una zoonosis del tipo anfizoonosis.

Como sucede en la mayoría de las zoonosis, los focos naturales de esta tripanosomiasis son muy variados, debido a la gran diversidad de mamíferos que sirven de hospedadores al **Trypanosoma cruzi** y, a la multiplicidad y difusión de los triatomíneos, muchos de los cuales son poco exigentes en cuanto a las condiciones ambientales (euritropos) y poco exigentes en cuanto al hospedador que les suministra alimentación (euritrofos).

Una vez reconocido el carácter zoonótico de la enfermedad de Chagas, diversos investigadores han procurado demostrar la infección de gran variedad de animales silvestres, mediante el hallazgo de tripanosomas semejantes o idénticos al **Trypanosoma cruzi**<sup>4-36</sup>.

Hasta el presente se consideran como reservorios del **Trypanosoma cruzi** en América, los siguientes mamíferos:

#### 1.— **Marsupiales:**

*Didelphis aurita* (rabipelado, gamba o zarigüeya)

*Didelphis marsupialis* (rabipelado, gamba o zarigüeya)

*Didelphis azarae* (rabipelado)  
*Didelphis virginiana* (rabipelado)  
*Didelphis paraguayensis* (rabipelado)  
*Lutreolina crassicaudata crassicaudata* (micure coligrueso)  
*Lutreolina crassicaudata paranalís* (micure o cuica)  
*Marmosa agilis agilis* (comadreja, raposa o micure)  
*Marmosa cinerea cinerea* (comadreja)  
*Marmosa mitis casta* (comadreja)  
*Marmosa pallidior* (comadreja)  
*Metachirops opossum opossum* (cuica o micure)  
*Metachirops nudicaudatus* (cuica o micure)  
*Monodelphis domestica domestica* (rabipelado)  
*Philander philander* o *Caluromis trinitatis* (rabipelado)  
*Philander opossum opossum* (rabipelado, gamba)  
*Chironectes minimus* (mucura de agua)

## 2.— **Quirópteros:**

*Molossus obscurus* (murciélago)  
*Phyllostomus elongatum* (murciélago)  
*Artibeus jamaicensis jamaicensis* (murciélago)  
*Eumop abrasus* (murciélago)  
*Carollia perspicillata* (murciélago)  
*Phyllostomus hastatus* (murciélago)  
*Eumop bonariensis beckeri* (murciélago)

## 3.— **Primates:**

*Saimiri sciureus* (mono)  
*Saimiri boliviensis* (mono)  
*Cebus apella* (mono)  
*Cebus capucinus* (mono)  
*Cebus flavus* (mono)  
*Alouatta senicola* (mono araguato)  
*Callithrix jacchus* (mono)  
*Callithrix penicillata jordani* (mono)  
*Callicebus nigriformis* (mono)  
*Tamarinus nigricollis* (mono)

#### 4.— **Desdentados:**

*Tamandua tetradactyla tetradactyla* (oso hormiguero)  
*Dassypus novemcinctus novemcinctus* (cachicamo, tatú)  
*Dassypus novemcinctus mexicanus* (cachicamo o armadillo)  
*Dassypus novemcinctus fenestratus* (cachicamo o tatú)  
*Dassypus novemcinctus texanus* (cachicamo o armadillo)  
*Dassypus pentadactylus* (cachicamo, armadillo o tatú)  
*Euphractus sexcinctus flavimanus* (cachicamo)  
*Cabbassous unicinctus* (cachicamo, tatú o armadillo)  
*Cabbassous lugubris* (cachicamo, tatú o armadillo)  
*Chaetophractus vellerosus vellerosus* (cachicamo)  
*Chaetophractus vellerosus pannosus* (cachicamo)  
*Chaetophractus villosus* (cachicamo)  
*Tolypeutes matacos* (cachicamo)  
*Zaedyus pichi caurinus* (cachicamo)

#### 5.— **Carnívoros:**

*Canis familiaris* (perro doméstico)  
*Felis domesticus* (gato doméstico)  
*Mephitis mephitis* (zorrillo)  
*Tayra barbara* (irara)  
*Eira barbara barbara* (eira)  
*Eira barbara poliocephala* (eira)  
*Nasua nasua solitaria* (coatí o pesote)  
*Nasua narica* (coatí o pesote)  
*Nasua narica bullata* (coatí o pesote)  
*Cerdocyon thous azarae* (perro de monte)  
*Dusicyon culpeus culpeus* (perro de monte)  
*Dusicyon culpeus andinus* (perro de monte)  
*Dusicyon gracilis gracilis* (perro de monte)  
*Dusicyon griseus griseus* (perro de monte)  
*Urocyon cinero-argenteus* (perro silvestre)  
*Procyon lotor* (lobo o mapache)  
*Grisonella huronax* (hurón o furón)  
*Grisonella ratellina* (hurón o furón)  
*Galicitis cuja furax* (hurón o furón)

## 6.— **Roedores:**

*Dasyprocta azarae azarae* (picure, coatí o agutí)  
*Dasyprocta agutí* (picure, coatí o agutí)  
*Dasyprocta rubrata* (picure, coatí o agutí)  
*Akodon arviculoides cursor* (akodon)  
*Galea spixii spixii* (prea)  
*Coendou insidiosus insidiosus* (puerco espín)  
*Coendou prehensilis* (puerco espín u ourico)  
*Coendou mexicanus laenatus* (puerco espín)  
*Cavia aperea aperea* (cobaya o acure)  
*Cavia porcellus* (cobaya o acure)  
*Cuniculus paca paca* (lapa)  
*Sciurus gerrardi morulus* (ardilla o esquilo)  
*Guerlinguetus gilvularis* (ardilla o esquilo)  
*Leptosciurus argentinus* (ardilla o esquilo)  
*Citellus leucurus cinnamomeus* (ardilla o esquilo)  
*Oryzomys subflavus subflavus* (rata)  
*Nectomys squanipes amazonicus* (rata de agua)  
*Nectomys squanipes squanipes* (rata)  
*Neotoma albigula albigula* (rata de monte)  
*Neotoma alleni* (rata de monte)  
*Neotoma fuscipes macrotis* (rata de monte)  
*Neotoma micropus canescens* (rata de monte)  
*Neotoma micropus micropus* (rata de monte)  
*Peromyscus boylei rowleyi* (ratón)  
*Peromyscus truei gilberti* (ratón)  
*Rattus rattus rattus* (rata)  
*Rattus rattus norvegicus* (rata)  
*Rattus rattus alexandrinus* (ratón doméstico)  
*Rattus rattus frugivorus* (rata)  
*Mus musculus brevirostri* (ratón doméstico)  
*Octodon degus degus* (dego o degú)  
*Cercomys cunicularius laurentius* (rata)

## 7.— **Artiodáctilos:**

*Sus scrofa* (puerco o cerdo)  
*Capra hircus* (cabra)

## 8.— **Lagomorfos:**

*Sylvilagus orinoci* (conejo)  
*Oryctolagus cuniculus* (liebre)

Según Pifano<sup>37</sup> y Díaz<sup>38</sup>, en Venezuela hasta 1962 se habían identificado los siguientes reservorios:

### 1.— **Marsupiales:**

*Didelphis marsupialis* (rabipelado)  
*Didelphis aurita* (rabipelado)  
*Caluromis trinitatis* (rabipelado)  
*Marmosa mitis casta* (comadreja)

### 2.— **Roedores:**

*Dasyprocta nublata* (picure)  
*Cuniculus paca* (lapa)  
*Coelogenis subniger* (lapa)  
*Coendu prehensilis* (puerco espín)  
*Guerlinguetus gilvularis* (ardilla)  
*Rattus rattus* (rata)  
*Rattus norvegicus* (rata)

### 3.— **Primates:**

*Cebus apella* (mono)  
*Alouata senicola* (araguato)  
*Cebus capucinus* (mono)

### 4.— **Desdentados:**

*Dassypus unicinctus* (cachicamo)  
*Dassypus sexcinctus* (cachicamo)  
*Dassypus novemcinctus* (cachicamo)  
*Dassypus pentadactylus* (cachicamo)  
*Tamandua tetradactyla* (oso hormiguero)

## 5.— **Lagomorfos:**

*Sitvylagus orinoci* (conejo)

## 6.— **Carnívoros:**

*Canis familiaris* (perro doméstico)

*Felis domesticus* (gato doméstico)

## 7.— **Quirópteros:**

*Artibeus jamaicensis equatorialis* (murciélago)

*Phyllostomus hastatus* (murciélago)

*Phyllostomus elongatum* (murciélago)

*Molossus obscurus* (murciélago)

El problema de los focos de reservorios silvestres del **Trypanosoma cruzi**, ha despertado últimamente gran interés entre los investigadores y sanitarios, por la gran importancia epidemiológica que representa la adaptación de estos focos al domicilio humano y por la identificación, cada vez más frecuente de tripanosomas morfológicamente semejantes al **Trypanosoma cruzi** pero no siempre idénticos en su comportamiento inmunológico y patógeno como refieren Chagas<sup>39</sup>, Brener e Chiari<sup>40</sup>, Nussenzweig y cols.<sup>41</sup> y Deane y cols.<sup>42</sup>.

De todos los reservorios descritos, uno de los más importantes por su amplia distribución y abundancia es el **Didelphis** s.p. (rabipelado).

Desde que Robertson<sup>43</sup> 1929 en Honduras observó el **Didelphis marsupialis**, Linnaeus 1758, naturalmente infectado por el **Trypanosoma cruzi**, son muchos los autores que han verificado la infección de diversos Didelphideos en casi toda América. Entre las diversas especies del género **Didelphis**, el **Didelphis marsupialis** fue encontrado infectado en Venezuela por Gabaldón<sup>44</sup> 1930; Días y Pifano<sup>45</sup> 1941; Dao 1945; Mayer, Pifano y Medina<sup>46</sup> 1946; Torrealba, Pifano y Romer<sup>47</sup> 1951 y Pifano 1960. También ha sido reportado en otros países como en Colombia por Hernández Mora<sup>48</sup> 1946; en Brasil por Rodrigues & Mello<sup>49</sup> 1942; Deane<sup>24</sup>

1961, Guimaraes & Jansen<sup>50</sup> 1943; en Ecuador por Alvarez Crespo<sup>51</sup> 1947 y Espinoza<sup>52</sup> 1955; en Guayana francesa por Floch & Lajudie<sup>53</sup> 1942-1943 y Floch & Abonnenc 1959; en Panamá por Zeledon<sup>54</sup>; en Guatemala por León<sup>55</sup> 1959; en Méjico por Aguirre Pequeño<sup>56</sup> 1947 y Díaz Peria y Brenes 1947; en Estados Unidos de Norte América por Kofoid & Donat<sup>57</sup> 1933; Norman, Allain & Gorman<sup>58</sup> 1947 y Mc. Keever, Gorman y Norman<sup>59</sup> 1958.

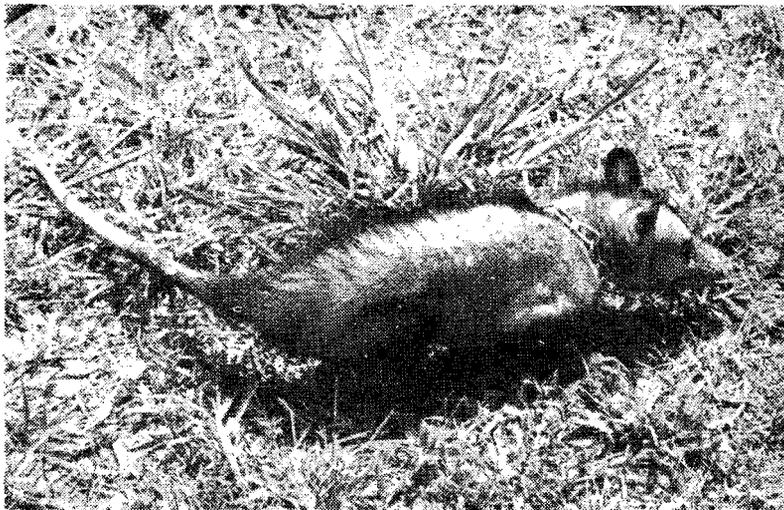
Según Barretto<sup>11</sup> también han sido señaladas como reservorios, las especies **Didelphis aurita** Wied 1826; **Didelphis azarae** Temmink 1827 y **Didelphis virginiana**.

Sin embargo, no podemos tener la certeza de que todos los hallazgos se refieran al **Trypanosoma cruzi** ya que, en la mayoría de los trabajos citados, faltan elementos de juicio suficientes. Según Floch y Abonnenc<sup>60</sup> los Didelphideos albergan tripanosomas que aun cuando sean diferentes al **Trypanosoma cruzi** se desarrollan en los triatominos originando formas metacíclicas en el intestino posterior; por otra parte, en muchos animales (monos y murciélagos) existen trypanosomas morfológicamente semejantes o idénticos al **T. cruzi** diferenciándose únicamente por su comportamiento inmunológico y patogénico en animales de experimentación. Según lo antes expuesto el simple hallazgo de tripanosomas en extendidos y xenodiagnósticos no permite considerar al rabipelado como reservorio de la enfermedad de Chagas mientras no se demuestre que se trata del **Trypanosoma cruzi**.

El rabipelado **Didelphis marsupialis** (Fig. 1) es un marsupial caracterizado por su aspecto similar al de una rata; mide 45 cms. de longitud sin contar la cola que mide 35-45 cms.

La cabeza es voluminosa, alcanzando una longitud aproximadamente igual a la cuarta parte del tronco; el hocico es largo, puntiagudo y provisto de bigotes largos; las orejas son grandes, peladas, negras y membranosas; la boca es grande, rasgada, llegando casi hasta los ojos y en su interior se encuentran 50 dientes dispuestos de la siguiente manera: Incisivos: 10 superiores y 8 inferiores; Caninos: 2 superiores y 2 inferiores; Premolares: 6 superiores y 6 inferiores; Molares: 8 superiores y 8 inferiores. Los incisivos son diminutos, todos muy parecidos entre sí,

por lo que se les llama poliprotodontos (muchos dientes anteriores).



**Fig. 1.** *Didelphis marsupialis* (rabilpelado) capturado en Zipayare - Edo. Zulia.

El pelaje de la cabeza es blanquecino con un cerco mal definido alrededor de cada ojo. El color general es ceniciento, marrón oscuro o negruzco con el pelo blanco sucio en la base y negro o muy oscuro hacia la punta que es el color que domina. Su pelaje es espeso y sobresalen cerdas largas y fuertes.

La cola es tan larga como el cuerpo y la cabeza juntos, o un poco más corta, es prensil escamosa y pelada salvo donde se extiende el pelaje del cuerpo. Es negra en sus 2/3 anteriores y blanca en su porción terminal.

Las patas poseen 5 dedos provistos de uñas fuertes; en las patas posteriores el primer dedo se opone a los demás de tal forma que son prensadores y asidores.

Las hembras poseen una bolsa ventral o **marsupia** con amplia abertura hacia adelante y dentro de ella se encuentran las

mamas en número de 13, una central y 6 a cada lado dispuestas en dos líneas curvas que dibujan una herradura.

Viven en las espesuras próximas a los arroyos, son de hábitos nocturnos, pasan la mayor parte de su vida en los árboles donde trepan con gran facilidad ayudados por la cola. Durante el día duermen en huecos de árboles, entre raíces, en nidos abandonados de pájaros o montones de hojas. En el suelo su marcha es lenta, es poco feroz y cuando se ve atacado prefiere fingirse muerto a responder al ataque, aun cuando es poco atacado por otras especies debido al olor penetrante y desagradable que despiden.

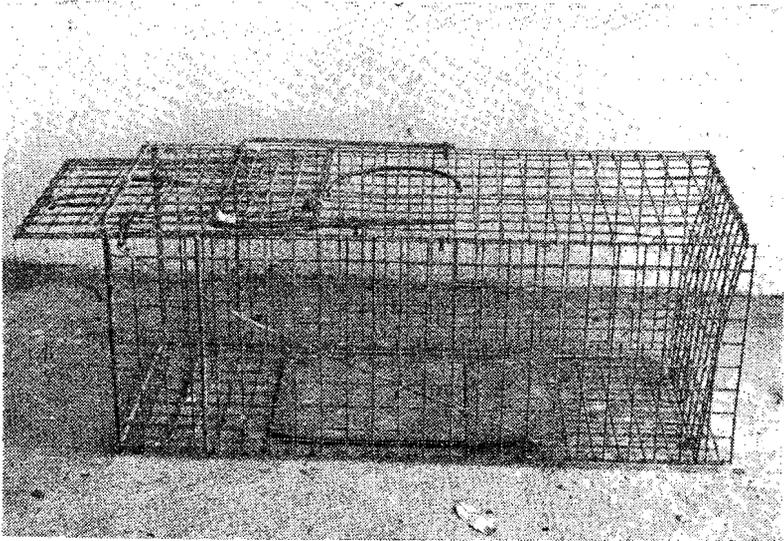
Se alimenta de pequeños mamíferos, aves y sus huevos, insectos, larvas de insectos, cangrejos de agua dulce, raíces y frutas especialmente guineos.

Las hembras procrean de 10 a 18 hijos cada uno de los cuales nace como una masa gelatinosa, informe, desnuda, de 2 cms. de longitud aproximadamente, con la cabeza y los miembros apenas diferenciados y sin movilidad voluntaria. Después de su nacimiento se arrastran e introducen en la marsupia de la madre; para mamar, la madre los coloca en el pezón donde se fijan por medio de unos músculos especiales, como no pueden succionar por sí mismos, la madre inyecta la leche automáticamente en forma continua, mediante la compresión de la glándula mamaria por músculos destinados a tal fin; como la inyección de leche es continua, para que el animalito no muera asfixiado, su aparato respiratorio no comunica con el interior de la cavidad bucal en la primera época de la vida.

Una vez que alcanzan mayor tamaño, abandonan la marsupia y se agarran a la cola de la madre sosteniéndose en su dorso hasta adquirir la independencia absoluta. Cabrera, Maluquer y Lozano<sup>61</sup>, Cabrera y Yépez<sup>62</sup>.

## **MATERIAL Y METODO**

Para la captura de los rabipelados, se utilizaron jaulas (Fig. 2) de forma rectangular que miden 15 cms. de ancho, 15 cms. de alto y 47,5 cms. de largo, construidas con mallas de alambre



**Fig. 2. Jaula utilizada para la captura del *Didelphis marsupialis*.**



**Fig. 3. *Didelphis marsupialis* (rabelado) en el interior de la trampa utilizada para su captura.**

fuerte con aberturas de 2,5 cms. En el centro de la jaula provista de una sola puerta ubicada en uno de los extremos, existe una platina articulada por medio de un alambre a dicha puerta. El cebo o carnada constituido por una masa de sardinas rodeada por avena, es suspendida en el techo de la jaula, por detrás de la platina. Cuando el animal se introduce en la jaula en busca de la carnada, pasa por encima de la platina accionándola y cerrando la puerta de tal forma que el animal no puede ser herido en el momento de la captura.

Las trampas eran colocadas a las 6 p.m. en las partes bajas de las montañas, cerca de las corrientes de agua, donde los animales acuden para saciar la sed, y eran recogidas a las 6 a.m.

Una vez capturado el animal, se procedió a la investigación de tripanosomas, para lo cual practicamos: **Examen de sangre periférica** al fresco, y extendido y gota gruesa coloreados por el Giemsa, tomando la muestra por punción de la punta de la cola. **Hemocultivo** en medio N.N.N. y L.I.T. este último, medio líquido ideado por Yaeger y según descripción de Chiari y Brener<sup>63</sup> y Camargo<sup>64</sup>, sembrando en cinco tubos de cada medio 3 a 4 gotas de sangre tomada en forma aséptica por punción cardíaca; los medios se mantenían a una temperatura de 22—25°C. y se examinaron cada semana durante un mes.

**Xenodiagnóstico** utilizando 10 ninfas de **Rhodnius prolixus**, criadas en el laboratorio, en quinto estadio evolutivo, alimentadas con sangre de pavo y mantenidas en ayuno de 30 días antes de practicar el examen. Para efectuar el xenodiagnóstico colocamos las ninfas en el interior de envases de cartón de forma cilíndrica de 4,5 cms. de diámetro que tienen en su fondo una lámina de plástico, la boca es tapada con una malla de nailon sujeta por un anillo de cartón que se coloca en la boca del envase, el cual se aplica en la cara ventral del animal previo rasuramiento. Treinta días después practicamos la lectura, empleando la técnica descrita por Soto<sup>65</sup> y Soto & Soto<sup>66</sup> según la cual se toma el insecto por medio de una pinza a nivel del tórax y con una tijera practicamos un corte a nivel del último segmento abdominal; haciendo presión sobre el abdomen obtene-

mos su contenido el cual se diluye en una gota de solución fisiológica colocada en una lámina portaobjetos y se observa al microscopio con aumento de 400 X. En caso de ser positivo para flagelados, se practicó coloración con Giemsa para diferenciar morfológicamente el **Trypanosoma cruzi** del **Trypanosoma rangeli**. Una vez identificado morfológicamente el tripanosoma como semejante al **Trypanosoma cruzi**, se procedía a inocular ratones blancos con el material obtenido.

Verificada la infección de los ratones, se procedió al estudio del comportamiento de la cepa aislada utilizando como elementos de juicio para la identificación del flagelado como **Trypanosoma cruzi**, los parámetros señalados por Barretto<sup>13</sup> es decir: susceptibilidad para los triatominos con la presencia de tripanosomas metacíclicos en el intestino posterior; inoculabilidad a animales de laboratorio con el hallazgo de formas sanguíneas; presencia de nidos leishmánicos en los tejidos del animal inoculado; datos biométricos comparables a los del **Trypanosoma cruzi**; Cultivabilidad en los medios de agar sangre e inmunidad cruzada con otras cepas de **Trypanosoma cruzi**.

Para el estudio de la cepa de cada uno de los rabi pelados, se inocularon por vía peritoneal 5 ratones blancos (*Mus musculus*) de 18-21 día de edad con 0,1 cc. de una suspensión de heces de triatominos conteniendo formas de tripanosoma metacíclico en solución salina fisiológica.

A partir del día siguiente de la inoculación, se investigó la presencia de formas de tripanosoma en la sangre periférica por examen al fresco de sangre tomada por sección de la extremidad de la cola; en caso de ser positivo, se procedía posteriormente a realizar contajes trisemanales siguiendo la técnica descrita por Pizzi<sup>67</sup> a fin de estudiar el grado de parasitemia.

La morfología de los tripanosomas sanguíneos fue estudiada en extendidos de sangre periférica realizados en diversas épocas de la infección y coloreados por el método de Giemsa.

La biometría fue practicada en diseños obtenidos por decalcado de las imágenes por proyección directa en cámara clara,

con un aumento de 1.200 X aproximadamente y siguiendo la técnica descrita por Días & Freitas<sup>68</sup>.

Para el estudio del parasitismo tisular, fueron sacrificados animales en plena fase aguda de la infección y se realizaron cortes histológicos de corazón, hígado y bazo; los cuales fueron fijados por el formol, incluidos en parafina, cortados con un espesor de 8-10 micras y coloreados con hematoxilina-eosina.

Con la finalidad de estudiar la susceptibilidad de las cepas a los triatominos, se alimentaron lotes de ninfas de **Rhodnius prolixus** en 5º estadio evolutivo, sometidos a ayuno prolongado, dejando que se alimentaran hasta la repleción completa, la cual verificábamos cuando se retiraban espontáneamente. Una vez alimentadas, las ninfas fueron mantenidas a temperatura ambiente durante 30 días, luego de los cuales se procedió a la investigación de flagelados en el contenido intestinal, obteniendo el material por expresión abdominal y en caso de ser negativo se practica la sección del último segmento abdominal para obtener contenido intestinal, el material es suspendido en solución fisiológica, se colocan dos gotas sobre una lámina, se cubre con laminilla y luego se lleva al microscopio donde se identifican las formas por su movilidad y por coloración con Giemsa de extendidos de material positivo.

Preferimos la especie **Rhodnius prolixus**, por ser el transmisor natural más importante en Venezuela por su gran domiciliaridad y amplia difusión. Además se tiene la tendencia de utilizar la especie transmisora de la localidad, en base a las experiencias de Dias<sup>69</sup> quien practicando xenodiagnósticos en perros inoculados con una cepa de **Trypanosoma cruzi** venezolana, con ninfas de **Rhodnius prolixus** (especie venezolana) y **Triatoma infestans** procedente del Brasil, obtuvo mejores resultados con **Rhodnius prolixus**; igualmente Pifano<sup>70</sup> observó que se tenían mejores resultados del xenodiagnóstico cuando se utilizaban los triatominos provenientes de la misma región de la cual procedía la cepa, explicando el hecho como una mejor adaptación del protozooario al **Rhodnius prolixus** proveniente de la misma área que la cepa.

Se hizo el aislamiento de las cepas sembrando en 5 tubos de medio N.N.N. y L.I.T. 3 a 5 gotas de sangre obtenida por punción cardíaca de ratones previamente inoculados con cada una de las cepas en estudio. Los medios de cultivo fueron mantenidos a temperatura de 22—25°C. y examinados entre los 21 a 30 días después de la siembra.

No se pudo practicar pruebas de inmunidad cruzada por no disponer de una cepa de **Trypanosoma cruzi** de alta virulencia como es el caso de la cepa "Y" de origen humano, la cual según Silva & Nussenzweig<sup>71</sup> produce una infección en el 100% con mortalidad de 94% en 2 a 3 semanas, cuando es inoculada por vía intraperitoneal a ratones blancos jóvenes.

## RESULTADOS

De los 10 rabipelados capturados, 7 presentaron xenodiagnóstico positivo a formas evolutivas de tripanosoma, 2 en que todas las formas observadas correspondían a tripanosomas semejantes al **Trypanosoma cruzi** y 5 en los cuales encontramos infección mixta a **Trypanosoma rangeli** y formas semejantes al **Trypanosoma cruzi**; en sangre periférica 3 presentaron formas de tripanosomas semejantes al **Trypanosoma cruzi** y 1 presentó hemocultivo positivo en los medios N.N.N. y L.I.T.

Los resultados del estudio del comportamiento de las 7 cepas de tripanosoma semejantes al **Trypanosoma cruzi**, siguiendo los parámetros antes mencionados son los siguientes:

### **Infección en animales de experimentación.**

La inoculación del material obtenido por xenodiagnóstico practicado a cada Didelphideo en estudio, dio siempre resultados positivos, infectando la totalidad de los ratones inoculados. La infección de estos animales fue controlada y cuando alcanzó una parasitemia considerable se practicaron repiques en ratones jóvenes de 18 a 21 días empleando 0,1 cc. de sangre tomada por punción cardíaca utilizando la vía peritoneal.

Para estudiar el comportamiento de las cepas, se destinaron 5 ratones para cada una de ellas y se investigó la presencia de

formas sanguíneas a partir del día siguiente de la inoculación; una vez verificada la infección se procedió a contajes trisemanales.

Si analizamos los caracteres generales de la infección, que se encuentran resumidos en el cuadro I podemos observar que el período prepatente osciló entre 1-16 días, siendo en la mayoría de los ejemplares corto, 1-6 días, con excepción de la cepa del rabipelado N° 10 cuyos períodos prepatentes fueron de 11-10-16-8 y 10 días y un ejemplar de la cepa del rabipelado N° 4, con período prepatente de 16 días.

La parasitemia máxima fue muy baja con cifras que oscilaron entre 21 y 168 tripanosomas por mm<sup>3</sup> de sangre, por lo general alcanzada 30-40 días después de la inoculación.

La duración de la fase aguda de la infección osciló entre 34 y 60 días al cabo de los cuales la parasitemia caía a niveles submicroscópicos, siendo el examen de sangre periférica negativo.

Como ha demostrado Barreto<sup>10</sup> la patogenicidad de los tripanosomas provenientes de animales silvestres es muy variable cuando se inoculan a animales de laboratorio, existiendo cepas poco virulentas o desprovistas de agresividad, mientras que otras se muestran altamente virulentas ocasionando una elevada mortalidad. Con las cepas en estudio, nunca pudimos observar manifestaciones clínicas en los ratones inoculados que pudieran ser atribuidas a la infección por **Trypanosoma cruzi**. La mortalidad fue sólo del 8%.

Como puede apreciarse en el gráfico I las curvas parasitéticas mostraron ciertas variaciones individuales adoptando cuatro tipos de curvas diferentes:

- a) Ascenso irregular hasta alcanzar el máximo con caída brusca, es el caso del Rab. 4 Rat. 4.
- b) Ascenso regular hasta alcanzar el acmé parasitario y descenso con algunas irregularidades; Rab. 5 Rat. 2 y Rab. 11 Rat. 7.

## CUADRO I

CARACTERES GENERALES DE LA INFECCION EXPERIMENTAL DE RATONES INOCULADOS CON DIVERSAS CEPAS DE TRIPANOSOMAS AISLADAS DE RABIPELADO "*Didelphis marsupialis*".

No. del animal	Período prepatente	Parositemia Max. No. /mm <sup>3</sup>	Días	Fase aguda	Observaciones
Rab. 1 Rat. 10	3	140	30	52	
Rab. 1 Rat. 5	1	160	31	60	
Rab. 1 Rat. 23	3	112	27	--	Murió a 27 d.
Rab. 1 Rat. 12	3	105	40	51	
Rab. 1 Rat. 30	2	119	38	60	
Rab. 4 Rat. 4	16	140	36	50	
Rab. 4 Rat. 35	3	112	46	54	
Rab. 4 Rat. 23	4	77	34	41	
Rab. 4 Rat. 34	4	70	38	41	
Rab. 4 Rat. 13	3	84	40	44	
Rab. 5 Rat. 22	1	77	32	36	
Rab. 5 Rat. 2	5	108	20	53	
Rab. 5 Rat. 31	3	105	20	40	
Rab. 5 Rat. 14	2	91	31	34	
Rab. 5 Rat. 29	3	42	35	40	
Rab. 6 Rat. 21	4	35	10	36	
Rab. 6 Rat. 6	6	119	34	47	
Rab. 6 Rat. 29	3	42	12	--	Murió a 14 d.
Rab. 6 Rat. 15	2	112	38	43	
Rab. 6 Rat. 20	1	98	35	38	
Rab. 7 Rat. 1	3	42	20	50	
Rab. 7 Rat. 33	3	112	20	34	
Rab. 7 Rat. 16	2	77	21	30	
Rab. 7 Rat. 32	4	160	34	42	
Rab. 7 Rat. 19	4	28	10	--	Murió a 12 d.
Rab. 10 Rat. 8	11	42	22	34	
Rab. 10 Rat. 18	10	49	38	41	
Rab. 10 Rat. 3	16	84	40	43	
Rab. 10 Rat. 25	8	77	41	48	
Rab. 10 Rat. 9	10	21	41	48	
Rab. 11 Rat. 26	3	42	60	53	
Rab. 11 Rat. 7	3	160	17	42	
Rab. 11 Rat. 27	2	140	35	41	
Rab. 11 Rat. 17	3	133	38	50	
Rab. 11 Rat. 11	1	147	32	43	

### GRAFICO I

TIPOS DE CURVAS PARASITEMICAS OBSERVADAS EN RATONES INOCULADOS CON DIVERSAS MUESTRAS DE TRIPANOSOMA DE RABIPELADOS "*Didelphis marsupialis*".



- c) Ascenso y descenso con irregularidades; Rab. 1 Rat. 5.
- d) Curvas completamente irregulares con niveles parasitarios muy bajos: Rab. 10 Rat. 3 y Rab. 7 Rat. 1.

De manera general, las curvas parasitémicas fueron bajas, si bien es cierto que como demostró Darman<sup>72</sup> la parasitemia no está en relación directa con la patogenicidad de la cepa de **Trypanosoma cruzi**.

### **Morfología de las formas sanguíneas.**

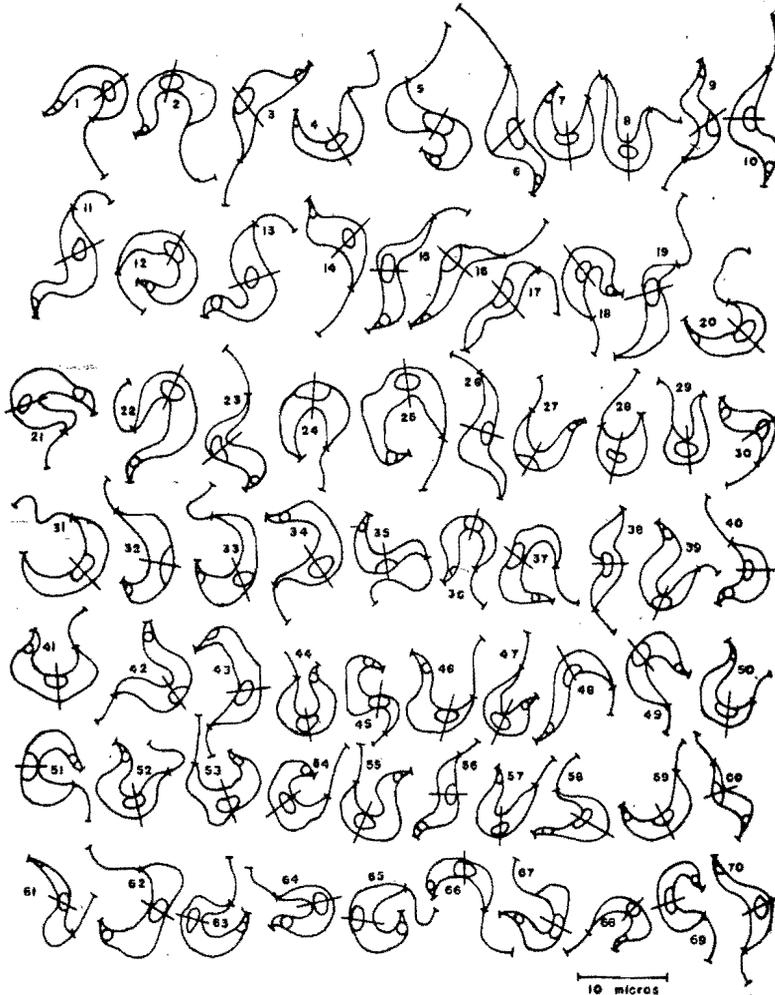
Como puede apreciarse en las figuras 3 (70 formas) y 4 los tripanosomas observados en extendidos de sangre periférica de ratones experimentalmente inoculados con las cepas en estudio, mostraron aspectos variables pero siempre semejantes al **Trypanosoma cruzi**, es decir: forma de C o S itálica, núcleo central o ligeramente anterior, cinetoplasto redondeado u ovoide, grande, de situación subterminal, membrana ondulante poco aparente con escaso número de ondulaciones y flagelo libre relativamente corto. En ninguno de los ratones inoculados con xenodiagnóstico proveniente de Rabipelado con infección mixta a **T. cruzi** y **T. rangeli**, fue posible poner en evidencia la presencia de tripanosoma con morfología comparable al **Trypanosoma rangeli**.

En la figura 3 presentamos los diseños de 70 tripanosomas observados en extendidos de sangre periférica de ratones inoculados con las cepas en estudio, en diferentes fases de la infección; en ellos podemos verificar que existen formas anchas y cortas (formas 14-28-41-54) con cinetoplasto muy próximo a la extremidad posterior, núcleo redondeado y flagelo libre relativamente largo que mide hasta 1/3 de la longitud total del parásito; formas delgadas y sinuosas (formas 9-15-16-17-20-61) con cinetoplasto más alejado del extremo posterior, núcleo largo y estrecho y flagelo libre corto que raramente sobrepasa 1/10 de la longitud total; al lado de estas formas se encuentran otras intermedias (formas 1-2-5-11-13).

Los resultados obtenidos de las micrometrías realizadas con curvímetro sobre los diseños hechos en papel, son presentados en el cuadro II y resumidos en los cuadros III, IV, V, VI, VII,

### FIGURA 3

DISEÑOS DE 70 TRIPANOSOMAS DE SANGRE PERIFERICA DE RATONES INOCULADOS CON DIVERSAS CEPAS DE RABIPELADO "*Didelphis marsupialis*", DECALCADOS DE IMAGENES OBTENIDAS POR PROYECCION DIRECTA CON CAMARA CLARA.



Los diseños del	1	al	10	corresponden a la cepa de Rabipelado	1
" "	" "	" "	20	" "	4
" "	" "	" "	30	" "	5
" "	" "	" "	40	" "	6
" "	" "	" "	50	" "	7
" "	" "	" "	60	" "	10
" "	" "	" "	70	" "	11

## CUADRO II

MEDIDAS HECHAS SOBRE 70 TRIPANOSOMAS DE SANGRE PERIFERICA DE RATONES EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS POR DIVERSAS CEPAS DE RABIPELADO "*Didelphis marsupialis*" EFECTUADAS CON CURVIMETRO SOBRE DISEÑOS HECHOS POR PROYECCION DIRECTA EN CAMARA CLARA Y EXPRESADAS EN MICRAS.

No.	Flagelo	N. A.	N. P.	Anchura	Cinetoplasto	Cuerpo	Total	NP/NA.
1	6,6	5,0	8,3	3,3	0,33	13,3	19,9	1,6
2	6,6	5,0	9,0	2,6	0,66	14,0	20,6	1,8
3	5,3	5,0	5,6	1,0	0,33	10,6	15,9	1,1
4	5,0	3,3	6,6	2,0	0,66	9,9	14,9	2,0
5	7,6	5,3	6,6	2,6	0,66	11,9	19,5	1,2
6	4,0	5,0	5,3	1,6	0,26	10,3	14,3	1,0
7	2,6	4,0	5,3	0,6	0,26	9,3	11,9	1,3
8	4,0	4,0	6,6	1,0	0,33	10,6	14,6	1,6
9	1,6	4,0	5,3	0,6	0,26	9,3	10,9	1,3
10	6,0	4,0	5,0	1,0	0,33	9,0	15,0	1,2
11	5,0	6,0	7,6	3,3	1,00	13,6	18,6	1,2
12	5,0	6,6	8,3	1,6	0,66	14,9	19,9	1,2
13	4,3	5,0	7,3	3,3	1,00	12,3	16,6	1,4
14	6,6	3,3	7,6	3,3	0,33	10,9	16,9	2,0
15	4,6	6,0	6,0	0,6	0,33	12,0	16,6	1,0
16	4,3	4,3	6,6	1,0	0,26	10,9	15,2	1,5
17	3,3	6,0	6,0	2,0	0,66	12,0	15,3	1,0
18	4,0	4,0	5,0	1,0	0,33	9,0	13,0	1,2
19	5,0	3,3	6,0	0,6	0,26	9,3	14,3	1,8
20	1,0	3,3	6,0	0,6	0,33	9,3	13,3	1,8

No.	Flagelo	N. A.	N. P.	Anchura	Cinetoplasto	Cuerpo	Total	NP/NA.
21	5,3	2,6	7,6	1,6	0,66	10,2	15,5	2,8
22	7,3	5,0	8,6	1,3	0,66	13,6	20,9	1,7
23	4,0	6,6	6,6	1,0	0,33	13,2	17,2	1,0
24	3,3	5,3	8,3	1,0	0,66	13,6	16,9	1,5
25	6,0	7,3	9,3	2,6	1,33	16,6	22,6	1,2
26	2,6	4,3	7,3	1,3	0,66	11,6	14,2	1,6
27	2,6	6,0	6,6	1,6	0,66	12,6	15,2	1,1
28	6,6	3,3	6,0	1,6	0,66	9,3	15,9	1,8
29	4,0	4,0	4,3	1,0	0,33	8,3	12,3	1,0
30	4,0	4,0	7,0	1,6	0,66	11,0	15,0	1,7
31	7,0	4,3	7,3	2,6	1,00	11,6	15,9	1,6
32	6,0	5,0	6,0	1,0	0,33	11,0	16,0	1,2
33	4,3	7,0	7,3	2,3	1,00	14,3	21,3	1,0
34	3,3	2,6	7,6	1,6	0,66	10,2	12,8	2,9
35	6,6	4,3	6,6	0,6	1,00	10,9	15,2	1,5
36	1,6	3,3	5,0	0,6	0,33	8,3	9,9	1,5
37	2,3	5,0	6,6	1,0	0,66	11,6	13,9	1,3
38	2,6	3,3	5,3	1,0	0,66	8,6	11,2	1,6
39	3,3	2,6	6,6	1,3	0,66	9,2	12,5	1,5
40	3,3	4,0	6,0	1,3	0,33	10,0	13,3	1,5
41	4,0	6,0	6,6	2,0	1,00	12,6	16,6	1,1
42	5,3	5,0	7,6	0,6	0,66	12,6	17,9	1,5

No.	Flagelo	N. A.	N. P.	Anchura	Cinetoplasto	Cuerpo	Total	NP/NA.
43	4,3	4,0	9,3	1,6	1,00	13,3	17,6	2,3
44	5,0	4,0	6,0	1,0	1,00	10,0	15,0	1,5
45	3,3	5,0	7,3	1,6	1,00	12,3	15,6	1,4
46	3,3	3,3	6,0	1,6	0,66	9,3	12,6	1,8
47	3,3	4,0	4,0	1,0	0,33	8,0	11,3	1,0
48	4,0	4,6	6,0	1,0	0,33	10,6	14,6	1,3
49	5,0	5,0	6,6	1,0	0,66	11,6	16,6	1,3
50	2,6	5,0	6,6	1,0	0,66	11,6	14,2	1,3
51	5,0	5,0	7,3	2,0	0,66	12,3	17,3	1,4
52	6,6	4,3	7,6	1,6	1,00	11,9	18,5	1,7
53	6,0	7,3	7,6	1,6	0,66	14,9	20,9	1,0
54	5,3	5,0	6,6	1,6	1,00	11,6	16,9	1,3
55	2,6	5,0	5,3	0,6	0,66	10,3	12,9	1,0
56	2,6	5,0	6,0	1,0	0,66	11,0	13,6	1,2
57	3,3	4,6	7,3	1,0	0,66	11,9	15,2	1,5
58	3,3	3,3	6,0	1,3	1,00	9,3	12,6	1,8
59	2,6	5,3	6,0	1,3	1,00	11,3	13,9	1,1
60	2,6	3,3	6,3	1,0	0,66	9,6	12,2	1,9
61	4,0	3,3	5,0	0,6	0,33	8,3	12,3	1,5
62	7,6	7,6	9,3	2,0	1,00	16,9	24,5	1,2
63	6,0	4,3	10,0	2,0	1,00	14,3	20,3	2,3
64	5,3	4,3	5,0	1,3	0,66	9,3	14,6	1,1
65	6,0	5,3	7,3	1,3	0,66	12,6	18,6	1,3

No.	Flagelo	N. A.	N. P.	Anchura	Cinetoplasto	Cuerpo	Total	NP/NA.
66	3,3	4,0	5,3	1,0	0,66	9,3	12,6	1,3
67	4,3	5,0	5,0	0,6	0,33	10,0	14,3	1,0
68	3,3	3,3	5,0	1,0	0,33	8,3	11,6	1,5
69	4,3	3,3	6,6	1,0	0,33	9,9	14,2	2,0
70	2,6	2,0	5,3	0,6	0,33	7,9	10,5	2,0

### CUADRO III

RESULTADO DE LA MICROMETRIA HECHA SOBRE 10 TRIPANOSOMAS DE SANGRE PERIFERICA DE RATONES EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS CON LA CEPA RAB. 1 RABIPELADO "*Didelphis marsupialis*".

#### CEPA RAB. 1

Micrometría	Medidas en micras		
	Mínima	Máxima	Media
Longitud del flagelo	1,6	7,6	4,93
Distancia N. A.	3,3	5,3	4,46
Distancia N. P.	5,0	9,0	6,69
Longitud del cuerpo	9,0	14,0	10,82
Longitud total	10,9	20,6	15,75
Anchura del cuerpo	0,6	3,3	1,63
Diámetro del cinetoplasto	0,26	0,83	0,45
Índice nuclear NP/NA	1,0	2,0	1,41

VIII y IX. Estas medidas se encuentran dentro de los límites de variaciones reportadas por los diversos autores que han estudiado cepas de *Trypanosoma cruzi* tanto de origen humano como animal y perfectamente comparables a las obtenidas por Floch & Lajudie<sup>73</sup> en cepas aisladas del *Didelphis marsupialis* en Guayana francesa y por Barreto<sup>10</sup> estudiando cepas provenientes del *Didelphis aurita* y del *Didelphis azarae*, donde siempre observa-

#### CUADRO IV

RESULTADO DE LA MICROMETRIA HECHA SOBRE 10 TRIPANOSOMAS DE SANGRE PERIFERICA DE RATONES EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS CON LA CEPA RAB. 4. DE RABIPELADO "Didelphis marsupialis".

#### CEPA RAB. 4.

Micrometría	Medidas en micras		
	Mínima	Máxima	Media
Longitud del flagelo	3,3	6,6	4,61
Distancia N. A.	3,3	6,6	4,78
Distancia N. P.	5,0	8,3	6,64
Longitud del cuerpo	9,0	14,9	11,42
Longitud total	13,0	19,9	15,97
Anchura del cuerpo	0,6	3,3	1,73
Diámetro del cinetoplasto	0,33	1,0	0,51
Índice nuclear NP/NA.	1,0	1,8	1,41

#### CUADRO V

RESULTADO DE LA MICROMETRIA HECHA SOBRE 10 TRIPANOSOMAS DE SANGRE PERIFERICA DE RATONES EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS CON LA CEPA RAB. 5 DE RABIPELADO "Didelphis marsupialis".

#### CEPA RAB. 5.

Micrometría	Medidas en micras		
	Mínima	Máxima	Media
Longitud del flagelo	2,6	7,3	4,57
Distancia N. A.	2,6	7,3	4,84
Distancia N. P.	4,3	9,3	7,16
Longitud del cuerpo	8,3	16,6	12,06
Longitud total	12,3	22,6	16,57
Anchura del cuerpo	1,0	2,6	1,46
Diámetro del cinetoplasto	0,33	1,33	0,56
Índice nuclear NP/NA.	1,0	2,8	1,54

## CUADRO VI

RESULTADO DE LA MICROMETRIA HECHA SOBRE 10 TRIPANOSOMAS DE SANGRE PERIFERICA DE RATONES EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS CON LA CEPA RAB. 6 DE RABIPELADO "*Didelphis marsupialis*".

### CEPA RAB. 6.

Micrometría	Medidas en micras		
	Mínima	Máxima	Media
Longitud del flagelo	1,6	7,0	4,03
Distancia N. A.	2,6	7,0	4,14
Distancia N. P.	5,0	7,6	6,43
Longitud del cuerpo	8,3	14,3	11,57
Longitud total	9,9	21,3	14,20
Anchura del cuerpo	0,66	2,6	1,33
Diámetro del cinetoplasto	0,33	1,0	0,66
Índice nuclear NP/NA.	1,0	2,9	1,56

## CUADRO VII

RESULTADO DE LA MICROMETRIA HECHA SOBRE 10 TRIPANOSOMAS DE SANGRE PERIFERICA DE RATONES EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS CON LA CEPA RAB. 7 DE RABIPELADO "*Didelphis marsupialis*".

### CEPA RAB. 7

Micrometría	Medidas en micras		
	Mínima	Máxima	Media
Longitud del flagelo	2,6	5,3	4,07
Distancia N. A.	3,3	6,0	4,59
Distancia N. P.	4,0	9,3	6,60
Longitud del cuerpo	8,0	13,3	11,19
Longitud total	11,3	17,9	15,20
Anchura del cuerpo	0,6	1,6	1,44
Diámetro del cinetoplasto	0,33	1,0	0,79
Índice nuclear NP/NA	1,0	2,3	1,59

### CUADRO VIII

RESULTADO DE LA MICROMETRIA HECHA SOBRE 10 TRIPANOSOMAS DE SANGRE PERIFERICA DE RATONES EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS CON LA CEPA RAB. 10 DE RABIEPELADO "Didelphis marsupialis".

#### CEPA RAB. 10.

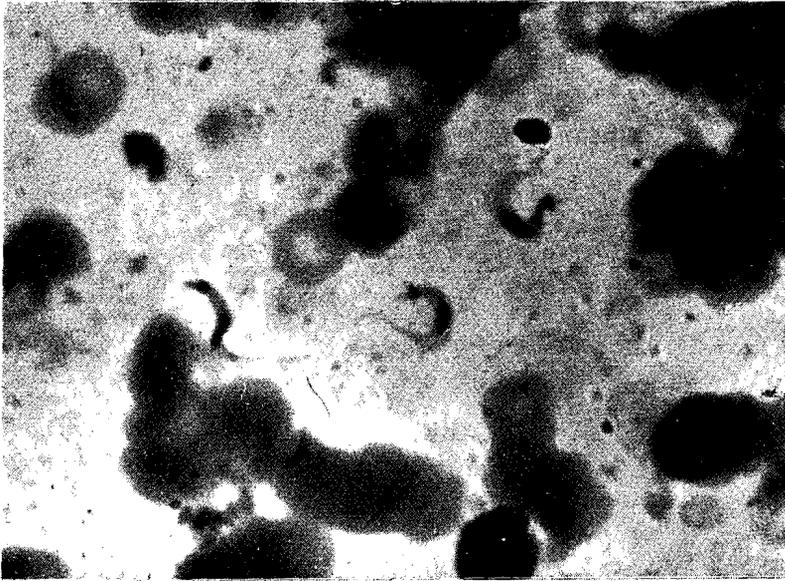
Micrometría	Medidas en micras		
	Mínima	Máxima	Media
Longitud del flagelo	2,6	6,6	3,86
Distancia N. A.	3,3	7,3	4,81
Distancia N. P.	5,3	7,6	6,60
Longitud del cuerpo	9,3	14,9	11,41
Longitud Total	12,2	20,9	15,40
Anchura del cuerpo	0,66	2,0	1,30
Diámetro del cinetoplasto	0,66	1,0	0,73
Indice nuclear NP/NA	1,0	1,9	1,39

### CUADRO IX

RESULTADO DE LA MICROMETRIA HECHA SOBRE 10 TRIPANOSOMAS DE SANGRE PERIFERICA DE RATONES EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS CON LA CEPA RAB. 11. DE RABIEPELADO "Didelphis marsupialis".

#### CEPA RAB. 11.

Micrometría	Medidas en micras		
	Mínima	Máxima	Media
Longitud de flagelo	2,6	7,6	4,67
Distancia N. A.	2,0	7,6	4,24
Distancia N. P.	5,0	10,0	5,38
Longitud del cuerpo	8,3	16,9	10,68
Longitud total	11,6	24,5	15,35
Anchura del cuerpo	0,6	2,0	1,14
Diámetro del cinetoplasto	0,33	1,0	0,56
Indice nuclear NP/NA.	1,0	2,3	1,52

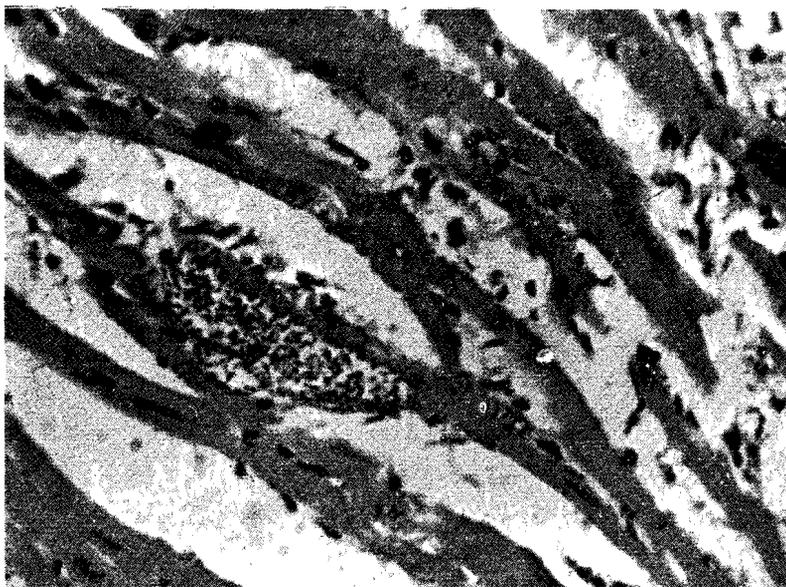


**Fig. 4. Trypanosomas en la sangre circulante de ratón experimentalmente inoculado con una de las cepas estudiadas.**

ron índices nucleares que oscilaban entre 1,15 y 1,63  $\mu$ . En nuestras observaciones los índices nucleares tuvieron variaciones más estrechas, oscilando entre 1,39 y 1,59 micras.

#### **Morfología de los elementos tisulares.**

Examinando los cortes histológicos de corazón, hígado y bazo de ratones muertos o sacrificados en plena fase aguda de la infección experimental con las cepas en estudio, en todos los casos encontramos nidos leishmánicos en fibras cardíacas (fig. 5); el parasitismo tisular fue muy escaso, siendo necesaria la revisión de gran número de cortes. Las leishmanias observadas en los cortes no muestran ninguna diferencia con las observadas en infecciones causadas por otras cepas de **Trypanosoma cruzi** de origen humano.



**Fig. 5.** Nido leishmánico en tejido miocárdico de ratón experimentalmente inoculado con una de las cepas estudiadas.

El examen de cortes de hígado y bazo fue siempre negativo para formas leishmania.

#### **Infección de triatominos.**

Procurando establecer la infectabilidad de las cepas de tripanosomas en estudio para el **Rhodnius prolixus**, se utilizaron lotes de 10 ninfas de quinto estadio evolutivo, provenientes de la colonia mantenida por el Departamento de Medicina Tropical y Microbiología de La Universidad del Zulia, alimentados en ratones en plena fase aguda de la infección causada por cada una de las cepas estudiadas. Los triatominos fueron examinados 30 días después de la alimentación obteniendo una infectabilidad que oscilaba entre 70 y 90 % de acuerdo con la cepa, como puede apreciarse en el cuadro X.

## CUADRO X

INFECTABILIDAD DEL *Rhodnius prolixus* A LAS DIVERSAS CEPAS DE TRIPANOSOMAS AISLADAS DE RABIPELADO "*Didelphis marsupialis*".

Cepa	Ejemplares alimentados	Ejemplares Nº	Positivos %
Rab. 1	10	8	80 %
Rab. 4	10	8	80 %
Rab. 5	10	9	90 %
Rab. 6	10	8	80 %
Rab. 7	10	9	90 %
Rab. 10	10	7	70 %
Rab. 11	10	8	80 %

Estos resultados muestran que las cepas de tripanosoma provenientes de rabipelados se desarrollaban bien en los triatominos, ya que además de infectar un gran porcentaje de ellos, pudo observarse un elevado número de formas flageladas en el contenido intestinal examinado.

### Cultivo.

El cultivo practicado en medios N.N.N. y L.I.T. con sangre proveniente de ratones en fase aguda de la infección se mostró positivo para formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi* en todas las cepas, observándose un crecimiento pobre.

En ninguno de los cultivos pudimos observar formas evolutivas semejantes al *Trypanosoma rangeli*.

### COMENTARIOS Y CONCLUSIONES

Una vez analizados los resultados obtenidos del estudio de las diversas cepas aisladas de los rabipelados capturados en la región de Zipayare, podemos identificar los tripanosomas aislados como *Trypanosoma cruzi* basados en la concordancia de

nuestros hallazgos con los parámetros aceptados actualmente para considerar un tripanosoma semejante al **Trypanosoma cruzi** como de esa especie. Por lo tanto debemos considerar el **Didelphis marsupialis** como un reservorio natural de la enfermedad de Chagas en la región de Zipayare.

Dada la alta incidencia de rabipelados infectados por el **Trypanosoma cruzi** en la naturaleza, es de suponer que la región de Zipayare representa un foco enzoótico natural de tripanosomiasis donde el parásito circula entre los animales silvestres por medio de vectores silvestres; esto tiene una gran importancia epidemiológica ya que a partir de los reservorios silvestres la infección puede pasar al hombre por intermedio de triatomos salváticos, cuando el hombre o animales domésticos penetran en el medio selvático o bien cuando el vector lleva el parásito a mamíferos del área peridomiliaria (ratas, ratones, murciélagos, etc.) de donde es tomado por triatomos de hábitos peridomiciliarios que a su vez infectan a animales domésticos transformándose así en fuente de infección para triatomos domiciliarios; otras formas posibles de infección serían a través de reservorios silvestres que se acercan a las habitaciones humanas en busca de alimento infectando a triatomos de hábitos peridomiciliarios y domiciliarios; y mediante triatomos de hábitos selváticos, infectados por reservorios silvestres que pueden invadir eventualmente la habitación humana e infectar directamente al hombre.

Una vez establecido el ciclo doméstico, éste sería fácilmente mantenido por el **Rhodnius prolixus**, que ha invadido las habitaciones construidas por la División de Vivienda Rural del Ministerio de Sanidad en el Asentamiento campesino en virtud de que sus habitantes han fabricado enramadas de palmas adosadas a sus viviendas para aumentar su capacidad, ya que por lo general se encuentran ocupadas por familias numerosas.

Es de hacer notar que la infección por **Trypanosoma cruzi** en los rabipelados parece tener un curso benigno ya que no se observaron manifestaciones clínicas en los ejemplares capturados, este hecho concuerda con las investigaciones realizadas por Barretto<sup>10</sup> quien inoculando experimentalmente rabipelados sanos con una cepa de **Trypanosoma cruzi** aislada de rabipelados cap-

turados en la naturaleza, observó la sobrevivencia del 100% de los ejemplares llevando una vida normal, las hembras soportaron la gravidez, tuvieron partos normales y sus hijos fueron criados sanamente, lo que confirma las observaciones de Romáña<sup>74</sup> de que no existe transmisión congénita de **Trypanosoma cruzi** entre los rabipelados.

La ausencia de manifestaciones clínicas en los animales capturados, puede explicarse también como debido al hecho de que estos animales hayan sido examinados durante la fase crónica de la infección, la cual les permite sobrevivir.

## RESUMEN

El autor hace consideraciones sobre las condiciones geográficas de Zipayare y el carácter enzoótico de la enfermedad de Chagas. Enumera los reservorios de la enfermedad hasta el presente demostrados en América y Venezuela y describe el **Didelphis marsupialis** desde el punto de vista morfológico y biológico.

Diez rabipelados fueron capturados en la región de Zipayare (Edo. Zulia-Venezuela), de los cuales siete presentaron formas de tripanosoma semejantes al **Trypanosoma cruzi** en los xenodiagnósticos practicados, de éstos, tres presentaron formas tripanosoma en sangre periférica y uno hemocultivo positivo. 5 de los 7 ejemplares encontrados infectados mostraron infección mixta a **T. cruzi** y **T. rangeli**.

Las siete capas aisladas se mostraron patógenas para los ratones blancos (*Mus musculus*), infectando el 100% de los animales inoculados por vía intraperitoneal con formas sanguíneas. El examen de sangre periférica de los ratones experimentalmente infectados demostró la presencia de tripanosoma cuya morfología es similar a la del **Trypanosoma cruzi** con índice nuclear de 1,39-1,59 micras. La infección de los ratones tuvo carácter benigno con períodos prepatentes cortos, parasitemia discreta, fase aguda prolongada y mortalidad del 8%.

Los cortes histológicos de miocardio mostraron nidos leishmánicos; el hemocultivo fue positivo para formas evolutivas de **Try-**

**panosoma cruzi** y la infectabilidad de las diversas cepas estudiadas para el **Rhodnius prolixus** osciló entre 70-90%.

## BIBLIOGRAFIA

- 1 — PONS, A. R.— Leishmaniasis tegumentaria Americana en el Asentamiento campesino de Zipayare. Aspectos epidemiológicos e Inmunológicos. Su importancia en la reforma agraria. *Kasmera* Vol. 3. N° 1. págs. 5-60. Diciembre 1968.
- 2 — CHAGAS, C.— Sobre un tripanosoma do tatu, *Tatusia novemcinctus*, transmitido pelo *Triatoma geniculata*. Posibilidade de ser o tatu um depositario do *Trypanosoma cruzi* no mundo exterior. Nota previa. *Brasil. Med.* 26: 305-306. 1912.
- 3 — BARRETTO, M. P.— Estudos sobre reservatorios e vectores silvestres do *Trypanosoma cruzi* XVI Contribuicao para o estudo dos focos naturais da tripanosomiasis americana con especial referencia á regioa nordeste do estado de Sao Paulo-Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* Vol. I. N° 2. pág. 23. marco-abril, 1967.
- 4 — MAZZA, S., MIYARA, S. y SANJURJO, H.— Comprobación de animales domésticos y de nuevas especies de mamíferos silvestres portadores de *Schizotrypanum cruzi* en los alrededores de Ciudad de Mendoza. IX. Reun. Soc. Arg. de Pat. Trop. *MEPRA.* 1: pp. 548-559. 1936.
- 5 — MAZZA, S.— Otros mamíferos infectados naturalmente por el *Shizotrypanum cruzi*, o *cruzi* similares en provincias de Jujuy y Salta. *MEPRA.* 45: págs. 119-134. 1940.
- 6 — MAZZA, S. y JÖRG, M. E.— Anatomía Patológica de la Enfermedad de Chagas y de animales naturalmente infectados por "*Schizotrypanum cruzi*", IX reunión de la Soc. Arg. de Pat. Reg., págs. 3-29. *MEPRA.* 1939.
- 7 — MAZZA, S. y LOBOS, M. M.— Casos de Enfermedad de Chagas y animales domésticos infectados naturalmente con *Schizotrypanum cruzi* comprobados en el Departamento de Trancas, provincia de Tucumán, *MEPRA.*, págs. 18-33. 1936.
- 8 — PIFANO, F.— Epidemiología de la Enfermedad de Chagas en el Estado Yaracuy, Venezuela. *Rev. de Sanid. y Asist. Soc.* VI, 3: págs. 303-316. 1941.
- 9 — BARRETTO, M. P. e cols.— Estudos sobre reservatorios e vectores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XI observacoes sobre um foco natural da trypanossomose Americana no Municipio de Ribeirao Preto, Sao Paulo. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 8 (3): 103-112. maio-junho. 1966.

- 10 — BARRETTO, M. P. e FERRIOLLI, F.— Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi* VIII. Oservacoes sobre a infeccao experimental de Gambas por Trypanossomos isolados destes animais. Rev. Brasil. Biol. 25 (1): 35-47. maio. 1955.
- 11 — BARRETTO, M. P. e cols.— Estudos sobre reservatorios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi* VII investigacoes sobre a infeccao natural de gambas por tripanossomos semelhantes ao *T. cruzi*. Rev. Brasil Biol. 24 (3): 289-300. outubro, 1964.
- 12 — BARRETTO, M. P. e SIQUEIRA, A. F.— Infeccao natural da *Lutreolina crassicaudata crassicaudata* pelo *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. Vol. 4. (6): 358-365. Nov-Dez. 1962.
- 13 — BARRETTO, M. P.— Trypanossomos semelhantes ao *Trypanosoma cruzi* em animais silvestres e sua identificacao com o agente etiológico da Doença de Chagas. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 7 (5): 305-315. 1965.
- 14 — BARRETTO, M. P. e cols.— Estudos sobre reservatorios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. VI Infeccao natural do roedor *Akodon arviculoides cursor* (Winge, 1885) por tripanossomo semelhantesao *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 7 (2): 72-81. 1965.
- 15 — DEANE, L. M.— Sobre um trypanossomo do tipo cruzi encontrado num rato silvestre, no Estado do Pará. Rev. Brasil. Malariaiol. e doencas tropicais. Vol. XII. Nº 2. : 87-102. abril-jun. 1960.
- 16 — CORREA, F. M. e BARRETTO, M. P.— Estudos sobre reservatorios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. III Infeccao natural do marsupial *Marmosa agilis agilis* por tripanossomo semelhantes ao *T. cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 6 (4): 157-166. julho-agosto 1964.
- 17 — FERRIOLLI, E. e BARRETTO, M. P.— Estudos sobre reservatorios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. IX Infeccao natural do *Rattus rattus* (Lin. 1758) por tripanossomo semelhante ao *T. cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 7 (3): 169-179. 1965.
- 18 — FERRIOLLI, F. e BARRETTO, M. P.— Estudos sobre reservatorios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XIV Infeccao natural da Preá *Cavia aperea aperea* por trypanossomo semelhante ao *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 8 (6): 267-276. 1966.
- 19 — ALBUQUERQUE, R. D. R. e BARRETTO, M. P.— Estudos sobre reservatorios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXXII. Infeccao natural do *Simio Callicebus nigrifrons* (Spix 1823) pelo *T. cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 11 (2): 115-122. marco-abril. 1969.

- 20 — ALBUQUERQUE, R. D. R. e BARRETTO, M. P.— Estudos sobre reservatorios e vectores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXVI. Infecção natural do rato d'água, *Nectomys squamipes squamipes* (Brants, 1827) pelo *T. cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 10 (4): 229-237. 1968.
- 21 — ALBUQUERQUE, R. D. R. e BARRETTO, M. P.— Estudos sobre reservatorios e vectores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXX Infecção natural do cachorro-do-mato, *Cerdocyon thous azarae* (Wied, 1824), pelo *T. cruzi*. Rev. Brasil. Biol. 28: 457-468. 1968.
- 22 — SIQUEIRA, A. F., FERRIOLLI, F. e BARRETTO, M. P.— Estudos sobre reservatorios e vectores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XVI. Infecção natural do Ourico, *coendou insidiosus insidiosus* por tripanossomo semelhante ao *T. cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 9 (3): 155-162. 1967.
- 23 — DEANE, L. M.— Novo hospedeiro de *Trypanosomas* dos tipos *cruzi* e *rangeli* encontrado no Estado do Pará: O marsupial *Metachirops opossum opossum*. Rev. Brasil. Malariol. e doenças tropicais. Vol. X. Nº 4., págs. 531-541. 1958.
- 24 — DEANE, L. M.— *Tripanosomídeos* de mamíferos da região amazônica. I Alguns flagelados encontrados no sangue de mamíferos silvestres do Estado do Pará. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 3 (1): 15-28. 1961.
- 25 — DEANE, L. M. e DAMASCENO, R. G.— *Tripanosomídeos* de mamíferos da região amazônica. II *Tripanosomas* de macacos da Zona do Salgado, Estado do Pará. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 3 (2): 61-70. 1961.
- 26 — DEANE, L. M.— *Tripanosomídeos* de Mamíferos da região Amazônica. III Hemoscopia e xenodiagnóstico de animais silvestres dos arredores de Belém-Pará. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 6 (5): 225-232. 1964.
- 27 — BARRETTO, M. P.— Reservatorios e vectores do *Trypanosoma cruzi* no Brasil. Arq. Hig. e Saúde publ. (Sao Paulo). 28: 43-66. 1963.
- 28 — FERREIRA, L. C. e DEANE, L. M.— Novo depositario silvestre do *Schizotrypanum cruzi* (Chagas 1909), a irara: *Tayra barbara* (L) Brasil Med. 52: 1159-1161. 1938.
- 29 — COURA, J. R.— *Tripanossoma* do complexo *cruzi* em reservatorios silvestres no Estado de Guanabara. Estudo de sua patogenidade. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 8 (3): 125-133. 1966.
- 30 — DEANE, L. M. e JANSEN, G.— Encontro de *Schizotrypanum cruzi* em marsupiais da espécie *Marmosa cinerea*. Brasil. Med. 53: 265-266. 1939.
- 31 — SOTO, S. T. de y SOTO U. R.— Infección natural de la *Dasyprocta azarae azarae* por un *trypanosoma* semejante al *Try-*

- panosoma cruzi. Rev. Fac. Med. Maracaibo. Vol. I. N° 2., pp. 15-25 Junio 1968.
- 32 — FERRIOLLI, F. e BARRETTO, M. P.— Estudos sobre reservatorios e vectores silvestres do Trypanosoma cruzi, XXIX. Infeccao natural da Nasua nasua solitaria Schinz 1821, pelo T. cruzi. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 10 (6): 354-363. 1938.
- 33 — TORRES, M.— Alguns fatos que interessan á epidemiologia da Molestia de Chagas. Mem. Inst. Osw. Cruz 7, 1915.
- 34 — MAYER, H. F. y ALCATRAZ, I.— Investigaciones sobre Esquizotripanosis en perros y gatos de la zona suburbana de Resistencia. Anales del Instituto de Medicina Regional Vol. 4. N° 1., pp. 9-17. 1954.
- 35 — FERRIOLLI, F. e BARRETTO, M. P.— Estudos sobre reservatorios e vectores silvestres do Trypanosoma cruzi, XXXV Infeccao natural do furao Galictis cuja furax (Thomas, 1907) pelo T. cruzi. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 11 (4): 264-273, julho-agosto. 1969.
- 36 — ALBUQUERQUE, R. D. R. e BARRETTO, M. P.— Estudos sobre reservatorios e vectores silvestres do Trypanosoma cruzi, XXXVII Infeccao natural do simio Callithrix penicillata jordani (Thomas, 1904) pelo T. cruzi. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 11 (6): 394-402. 1969.
- 37 — PIFANO, C. F.— Algunos aspectos de la Enfermedad de Chagas. Arch. Venez. Med. Trop. y Parasitol. Med. Vol. 3. N° 2, págs. 73-95. 1960.
- 38 — DIAZ, V. A.— Consideraciones epidemiológicas de la enfermedad de Chagas. Arch. Venez. Med. Trop. y Parasitol. Med. Vol. 3. N° 2., págs. 187-201. Dic. 1960.
- 39 — CHAGAS, F. C.— Molestia de Chagas no Brasil. Bol. of Sanit. Panamericana. 22: 773-779. 1943.
- 40 — BRENER, Z. e CHIARI, E.— Variacoes morfológicas observadas em diferentes amostras de Trypanosoma cruzi. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 5 (5): 220-224, 1963.
- 41 — NUSSENZWEIG, V., DEANE, L. M. e KLOETZEL, J.— Diversidade na constituicao antigenica de amostras de Trypanosoma cruzi isoladas do homem e de gambas. Nota preliminar. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 4 (6): 409-410. 1962.
- 42 — DEANE, M. P., BRITO, T. e DEANE, L. M.— Pathogenicity to mice of some strains of Trypanosoma cruzi isolated from wild animals of Brasil. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 5 (5): 225-235. 1963.
- 43 — ROBERTSON, A.— Note on a Trypanosome morphologically similar to Trypanosoma cruzi Chagas, 1909 found in a opossum, Didelphis marsupialis, captured at Tela, Honduras, Central América. 18th. Am Rep. Med. Dep. United Fruit CO: 239-310. 1929.

- 44 — GABALDON, A.— Nota histórica sobre los protozoos señalados en Venezuela. Gac. Med. Caracas. 37: 131-140. 1930.
- 45 — DIAS, E. y PIFANO, C. F.— Estudio experimental de um Schizotrypanum do morcego "Hemiderma perspicillatum" da Venezuela. Mem. Inst. Osw. Cruz. 36 (1): 78-98. 1941.
- 46 — MAYER, M., PIFANO, C. F. y MEDINA, R.— Aspectos epidemiológicos de la Enfermedad de Chagas en Venezuela. Bases para una campaña de Saneamiento aplicable a zonas endémicas del medio rural venezolano. Rev. Soc. Estud. Med. 13: 134-186. 1946.
- 47 — TORREALBA, J. F., PIFANO, F. y ROMER, M.— Investigaciones sobre Enfermedad de Chagas y Trypanosomiasis rangeli en el Dtto. Roscio. Edo. Guárico, Venezuela. Gac. Med. Caracas LVII: 111-125. 1951.
- 48 — HERNANDEZ MORA, C.— Contribución al estudio de la Enfermedad de Chagas en Colombia. Tesis. Univ. Nac. Bogotá 119 págs. 1943.
- 49 — RODRIGUEZ, B. A. y MELLO, G. B.— Contribuicao ao estudo da Tripanosomiasis Americana. Mem. Inst. Osw. Cruz. 37: 77-94. 1942.
- 50 — GUIMARAES, F. N. e JANSEN, G.— Novo transmissor silvestre do Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi (Chagas, 1909). Mem. Inst. Osw. Cruz. 38: 437-441. 1943.
- 51 — ALVAREZ CRESPO, J.— Informaciones epidemiológicas de la Enfermedad de Chagas en la localidad de Guayaquil 1942-1946. Gac. Med. de Guayaquil. 1: 311-318. 1947.
- 52 — ESPINOZA, L. A.— Epidemiología de la Enfermedad de Chagas en la República de Ecuador. Rev. Ecuat. Hig. Med. Trop. 12: 25-105. 1955.
- 53 — FLOCH, H. et LAJUDIE, P.— Cabassus lugubris et Didelphis cancrivora naturellement infectés par S. cruzi en Guayana Française. Publ. Inst. Pasteur Guyane 45: 1-4. 1952.
- 54 — Zeledon, R.— El problema de la Trypanosomiasis americana o Enfermedad de Chagas en Costa Rica 109 págs. Minist. Salubr. Publ. San José Costa Rica. 1952.
- 55 — LEON, J. R.— Estado actual de la Enfermedad de Chagas en Guatemala. Rev. Goiana Med. 5: 445-455. 1959.
- 56 — AGUIRRE PEQUEÑO, E.— Presencia de Trypanosoma cruzi en mamífero y triatomíneos de Nuevo León, Monterrey México. Arch. Med. Mex. 5: 359-363. 1947.
- 57 — KOFOID, C. A. and DONAT, F.— South American Trypanosomiasis of human tipe. Occurrence in mammals in the United States. Calif. West. Med. 38: 245-249. 1957.
- 58 — BROOKE, M. M., NORMAN, L., ALLAIN, D. and GORMAN, G. W.— Isolation of Trypanosoma cruzi-like organisms from

- Wild animals collectec in Georgia. J. Parasitol. 43 (supl.) 15. 1957.
- 59 — MCKEEVER, S., GORMAN, G. W. and NORMAN, L.— Occurrence of a Trypanosoma cruzi-like organism in some mammals from southwestern Georgia and Northwestern Florida. J. Parasitol. 44: 583-587. 1958.
- 60 — FLOCH, H. et ABONNENC, E.— Trypanosome de Didelphis marsupialis dont les formes metacycliques chez R. prolixus et T. rubrofasciata ressemblent a celles de T. mymecophagae. Publ. Institut Pasteur Guyane 171: 1-6. 1948.
- 61 — CABRERA, A., MALUQUER, J. y LOZANO, L.— Historia natural. Vida de los animales, de las plantas y de la tierra. Tomo 1 Zoología (vertebrados) 4a. edición. 1953.
- 62 — CABRERA, A. y YEPES, J.— Mamíferos Sud Americanos Tomo 1. 2da. edición. 1960.
- 63 — CHIARI, E. e BRENER, Z.— Contribuicao ao diagnóstico parasitológico da Doença de Chagas na sua fase crónica. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 8 (3): 134-138. 1966.
- 64 — CAMARGO, E. P.— Growth and differentiation in Trypanosoma cruzi I. Origen of metacyclic trypanosomes in liquid media. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 6 (3): 93-100. 1964.
- 65 — SOTO U, R. R.— El Xenodiagnóstico. Experiencia personal en 100 casos de Enfermedad de Chagas crónica. Kasmera Vol. 3. No. 3. pp. 167-225. 1970.
- 66 — SOTO, R. y SOTO, S. T. de.— Valor del Xenodiagnóstico en la fase crónica de la Enfermedad de Chagas. Rev. Fac. Med. Maracaibo. Vol. I. No. 1. marzo 1968.
- 67 — PIZZI, T.— Inmunología de la Enfermedad de Chagas. Santiago, Universidad de Chile, Colección de monografías biológicas de la Universidad de Chile. No. 7. págs. 183. 1957.
- 68 — DIAS, E. e FREITAS, FILHO, L.— Introducao ao estudo biométrico dos hemoflagelados do genero Schizotrypanum. I— Introducao, material e técnica, problemas e métodos. Mem. Inst. Osw. Cruz. Tomo. 38. fasc. 3. págs. 425-436. 1943.
- 69 — DIAS, E.— Xenodiagnóstico seriados em caes infectados com amostras Venezuelanas de "Schizotrypanum cruzi". Brasil Medico. LIV. (52): 859-861. Dez. 1940.
- 70 — PIFANO, C. F.— El diagnóstico parasitológico de la Enfermedad de Chagas en la fase crónica. Estudio comparativo entre la gota gruesa, el xenodiagnóstico, el hemocultivo, y las inoculaciones experimentales en animales sensibles. Arch. Venez. Patol. Trop. y Parasit. Med. Vol. II. No. 2. pp. 121-156. 1954.
- 71 — SILVA, L.H.P. e NUSSENZWEIG, V.— Sobre una cepa de Trypanosoma cruzi altamente virulenta para o camundongo branco. Separata da folia Clin. e Biol. 20 (3): 191-208. decembro, 1953.

- 72 — DARMAN, M.— Multiplication du *Trypanosoma cruzi* dans le sang périphérique de la souris par passages successifs. Recherche de la prémunition vis-à-vis des souches homologues et hétérologues. *Ann Parasit. Hum. Comp.* 18: pp. 166-179. 1941.
- 73 — FLOCH, H. et LAJUDIE, P.— Schizotrypanosomiase humaine et Schizotrypanosomes. *Publ. Inst. Pasteur Guyane No. 67.* págs. 1-6. 1943.
- 74 — ROMANA, C.— Falta de transmisión hereditaria de *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* en *Didelphis paraguayense* y comentarios sobre herencia del parásito en otros mamíferos. *An Inst. Med. Reg. Tucumán* 4: 149-154. 1955.