

ESTUDIO DE UNA CEPA DE *TRYPANOSOMA CRUZI* AISLADA DE TRIATOMIDEOS DE UNA LOCALIDAD DEL SUR DEL PERU

MAFALDA RUBIO D.*

En Febrero del presente año, fueron traídos a nuestra cátedra algunos reduvídeos de la especie *Triatoma infestans*, capturados por Félix y Neptalí Náquira, en una investigación epidemiológica sobre enfermedad de Chagas, en el Valle del Sama (Dpto. de Tacna).

Estos insectos, como ya fué descrito por esos autores¹, presentaron gran infección por *Trypanosoma cruzi*. Especialmente positiva fué una muestra tomada en la vecindad de un criadero de cuyes, en la localidad de Putina. Por ello fué elegida para realizar experiencias tendientes a estudiar la virulencia, tropismo y propiedades inmunológicas de esta nueva cepa de *Trypanosoma cruzi*.

Los resultados que aquí se relatan, en forma parcial y preliminar, corresponden a los siguientes aspectos que hasta ahora se han investigado:

a) Observación al fresco en microscopio de fases contrastadas y en frotis fijados y teñidos de las formas encontradas en las deposiciones de triatomas, y posteriormente, en la sangre de animales inoculados con ellas mismas. El objeto de este punto fué descartar la existencia de formas parasitarias que no correspondieran a *T. cruzi*, a la vez que comparar la nueva cepa, con la cepa "Tulahuén", que se mantiene largos años en este laboratorio².

b) Para aislar la cepa se inocularon animales sensibles al *T. cruzi*, con deposiciones de triatomas positivos.

c) La virulencia y tropismo tisular de estos parásitos se siguió mediante exámenes de parasitemias, curvas de sobrevivencia e histología de los animales inoculados, en los sucesivos traspasos.

(*) Cátedra de Parasitología, Prof. A. Neghme R. Universidad de Chile.

d) La cepa se trató de estabilizar en su virulencia, mediante pasajes repetidos cada cierto número de días en ratones genéticamente homogéneos, basándose en la experiencia que existía al respecto en el Departamento, con la cepa Tulahuén².

e) Para conocer la actividad antigénica de la nueva cepa aislada, se estudió en forma seriada el título de anticuerpos circulantes en ratones, cuyes y hamsters (*Cricetus auratus*).

f) Por el miotropismo demostrado por las cepas, a la vez que por la alta virulencia alcanzada, se quiso conocer la influencia que pudiera tener en el embarazo y la posibilidad de transmisión transplacentaria; por esto, en una oportunidad, se inocularon ratones hembras en el comienzo de la preñez.

g) Para estudios citobiológicos e inmunológicos, desde los primeros trasposos se trató de conseguir cultivos de la nueva cepa.

MATERIALES Y TECNICA

Parásitos: Las primeras formas, con las cuales se hicieron observaciones al fresco y en frotis fijados, y se inocularon ratones, fueron tomadas de una mezcla de deposiciones de 10 vinchucas altamente infestadas. Posteriormente, como la cepa prendió en ratones, se tomó sangre de éstos para las inoculaciones en otros animales de experimentación y para la obtención de cultivos.

Animales: Los animales primeramente infectados fueron ratones de cepa C3H, de una y medio meses de edad y de pesos entre 17 y 20 gramos. Esta elección se hizo, porque se sabía de experiencias anteriores³⁻⁴, que eran altamente sensibles al *T. cruzi* y habían servido para estabilizar la virulencia de la cepa Tulahuén². Cuando ya se obtuvo la estabilización de la cepa, se emplearon hamsters, de pesos entre 70 y 90 gramos, cuyes, de pesos entre 250 y 350 gramos, y perritos jóvenes, de uno a uno y medio meses de edad. En una oportunidad se inocularon 5 ratones hembras, de 2 meses de edad y 23 gramos de peso, que llevaban aproximadamente una semana de preñez. El total de animales empleados hasta el momento actual ha sido de 800 ratones, 40 cuyes, 40 hamsters y 18 perritos.

Observaciones microscópicas: Parásitos lavados por centrifugación, obtenidos de las deposiciones de triatomas positivos y de sangre de ratones en diferentes trasposos, se observaron al fresco, bajo contrastes de fases, y en frotis fijados en Bouin-Hollande durante una y me-

dia horas y teñidos con hematoxilina de Heidenhain (con la modificación de Holland)⁵ y con Giemsa.

Inoculaciones: Siempre se empleó la vía intraperitoneal. Los primeros ratones inoculados recibieron 80.000 elementos parasitarios de deposiciones de triatomas, obtenidas mediante presión suave con una pinza sobre el abdomen. Al prender la cepa en ratones, la sangre de éstos sirvió para las inoculaciones sucesivas, calculándose siempre una dosis de 300 mil a 500 mil por 100 gramos de animal.

Parasitemias: En todos los experimentos se realizaron exámenes cada 48 horas. La técnica usada fué la del cubre-objeto milimetrado, ya habitual en este laboratorio, y que ha sido descrita en numerosas oportunidades²⁻⁶⁻⁷⁻⁸.

Curvas de sobrevida: Con este objeto se separaron en cada traspaso grupos de 10 animales: 5 machos y 5 hembras, para descartar posibles diferencias con relación al sexo.

Estudio anátomo-patológico: Se ha realizado en ratones, hamsters y cuyes. En los ratones se siguió la evolución histológica de los 8 primeros traspasos, y posteriormente se ha incluido material del 12º y 15º traspaso. En hamsters y cuyes se dispone solamente de material del primer traspaso, pero ellos recibieron parásitos de virulencia estabilizada. Los sacrificios se hicieron cada 48 horas. Se tomaron muestras de omento y tejido conjuntivo subcutáneo, que fueron extendidas en porta-objetos, y de órganos tales como: piel, músculo esquelético, músculo liso, miocardio, médula ósea, ganglios linfáticos, timo, pulmón, hígado, bazo, páncreas, riñón, cerebro y cerebelo. En las hembras preñadas, se incluyeron además trozos de útero, placentas y fetos.

Como fijador se empleó el Bouin-Hollande, que se hizo actuar tres horas sobre los tejidos extendidos y 3 días sobre los órganos. Las inclusiones se hicieron en Petérfi⁹ y la tinción de tejidos extendidos y cortes de órganos fué con hematoxilina-azul-eosina¹⁰.

En ciertas oportunidades se pesó el bazo y algunos ganglios, calculándose la relación de ellos con el peso del animal total, expresada en porcentaje.

Serología: Se investigaron precipitinas y aglutininas en el ratón en el 1º, 3º y 7º traspaso, y en el hamster y el cuy, en el primer traspaso. Las muestras de sangre se tomaron cada 5 días, por punción cardíaca, bajo anestesia etérea. En ambos casos se trabajó con antígeno de cepa Tulahuén, por no disponer entonces de cultivos homólogos. Las precipitinas se determinaron con la técnica del anillo. El antígeno fué la fracción polisacárida de cultivos de cepa Tulahuén, preparada se-

gún la técnica de Muniz¹¹. Las aglutininas se investigaron en placa de Huddleson. El antígeno estuvo constituido por cultivo vivo de cepa Tulahuén a una concentración de 350 millones de elementos parasitarios por centímetro cúbico.

Cultivos: Desde los primeros pasajes en ratones, se llevó sangre de éstos, obtenida por punción cardíaca en condiciones de máxima esterilidad, a matraces con medio de Senskije¹². La incubación se hizo a 27°C y los repiques se efectuaron cada 10 días.

RESULTADOS

Morfología y movilidad de los parásitos aislados de triatomas y de sangre de ratones: En las deposiciones positivas se encontró abundante cantidad de elementos citidiformes y escasos trypanosomas metacíclicos. Si bien se observó grandes diferencias de tamaño entre las formas parasitarias, la movilidad y morfología correspondió plenamente con las características del *T. cruzi*. Se puede decir que las variaciones no fueron mayores que las habituales en los cultivos de *T. cruzi* de cepa Tulahuén en los cuales hubo gran semejanza.

En la sangre circulante de ratones, se encontraron trypanosomas gruesos y delgados; estos últimos se hicieron más frecuentes a medida que aumentó la virulencia de la cepa. Hubo entre las formas gruesas numerosas variaciones en la longitud y grosor, pero las hemos considerado sin importancia, porque no caen en límites extremos, y la movilidad y morfología, en cuanto a membranita ondulante, forma, tamaño y ubicación de los núcleos y aspecto citoplasmático, correspondieron plenamente a *T. cruzi* (ver figura N° 1).

Curso de la infección en ratones C3H.

Estabilización de la virulencia de la cepa.

α) *Parasitemias:* En los primeros ratones inoculados aparecieron formas gruesas circulantes a los 15 días después de la inoculación. Su número fué muy escaso. En los días sucesivos aumentaron lentamente hasta alcanzar, a los 26 días, un valor promedio de 500 parásitos por milímetro cúbico. La curva de parasitemias se siguió hasta los 47 días, fecha en que pereció el 100% de los animales. Se observó en el curso de ella, que la muerte se producía generalmente con parasitemias sobre 7.000 elementos por milímetro cúbico. A los 26 días de enfermedad, se sangró un grupo de animales y se realizó el segundo pasaje

en ratones, recibiendo cada uno de ellos 100.000 parásitos por vía intraperitoneal. En este segundo traspaso se observaron parasitemias positivas, aunque bajas, desde las 24 horas. Valores promedios de 3 a 15 trypanosomas por milímetro cúbico, se encontraron hasta los 10 días. A los 14 días hubo un aumento brusco a 900 elementos por milímetro cúbico, el cual continuó hasta el 20º día, en que se encontró un promedio de 2.000 elementos por milímetro cúbico. Posteriormente hubo un leve descenso que llegó a su máximo a los 26 días, con un valor promedio de parasitemias de 780 trypanosomas por milímetro cúbico. En los días sucesivos, se produjo un nuevo ascenso en todos los animales, hasta su muerte, ocurrida entre 30 y 45 días. En esta oportunidad, el traspaso se realizó a los 20 días. Se tuvo la precaución de inocular los nuevos animales, de la misma edad y peso, también con 100.0000 elementos parasitarios por 20 gramos de peso. En el tercero, cuarto y quinto traspaso, las curvas parasitémicas fueron muy similares a la descrita en el 2º traspaso. En estos tres pasajes, el repique de la cepa se hizo a los 20 días, en todos ellos se eligieron animales de la condición ya enunciada y se repitió la dosis de 100.000 parásitos por 20 gramos de animal. En el 6º traspaso se observó un precoz e intenso incremento de las parasitemias, por lo que se hizo el nuevo pasaje a los 16 días. En esta oportunidad, la muerte de todos los animales se produjo en un plazo máximo de 20 días.

Desde el 7º traspaso en adelante, se observaron ya al tercer día numerosas formas circulantes, obteniéndose un promedio de 500 parásitos por milímetro cúbico, al 4º día. El ascenso de las parasitemias continuó hasta el 10º día, en el que el promedio fué de 8.000 trypanosomas por milímetro cúbico. Este comportamiento de la cepa ha continuado igual hasta el 16º traspaso, el actual. Desde el 7º traspaso, la muerte se ha producido entre 10 y 12 días.

Los valores de las curvas descritas y la representación gráfica de ellos se encuentra en la tabla Nº 1 y el gráfico Nº 1. En ellos también se señala el comportamiento de las formas delgadas, las cuales aparecieron sólo en forma tardía, y en escaso número, cuando las parasitemias eran muy altas, hasta el 4º y 5º traspaso; en cambio, se hicieron presentes en forma precoz, desde el 6º traspaso en adelante.

Sobrevida: Desde el primer pasaje, la infección fué mortal para el 100% de los ratones, tanto machos como hembras.

En los primeros cinco traspasos, el tiempo de sobrevida fué de 30 a 47 días. En el 6º repique, la muerte de todos los animales se observó entre 12 y 20 días, y en lo sucesivo, inoculando siempre 100 mil pará-

T A B L A N° 1

Parasitemias promedios de ratones C3H inoculados con la "Cepa Peru" de TRYPANOSOMA CRUZI

(Valores tomados de grupos de 8 y 10 animales y expresados por 1 mm³)

(Las cifras colocadas entre paréntesis corresponden al porcentaje de formas delgadas)

D í a s	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30
1er. traspaso	0	0	0	0	0	0	0	14	20	20	72	143	574	1130	3004
2º traspaso	7	3	15	13	8	8	908	859	1357	2000	1103	998	780	3057	10285
7º traspaso	155	495	1662	4547	8331										
						(30%) (7.4%) (2.3%) (1%)									
															(0,1%)

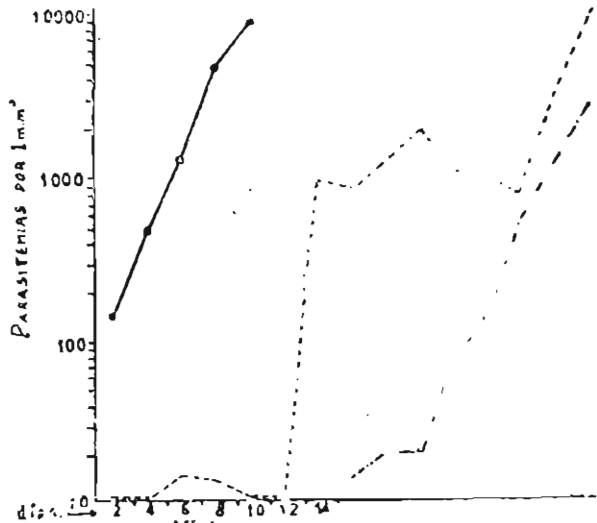
Dosis de inoculación: 1er. traspaso: 80.000 parásitos tomados de deposiciones de triatomas.

Dosis de inoculación: 2º y 7º traspaso: 100.000 parásitos tomados de sangre de lauchas C3H.

sitos por 20 gramos de peso, el fallecimiento de todos los animales ha ocurrido entre 10 y 20 días.

Estudio anatomopatológico: En los cinco primeros trasposos el aspecto de los ratones fué normal hasta el vigésimo día. Desde este momento apareció en ellos retardo de la curva ponderal, erizamiento del pelo y rubicundez y descamación de la piel. En los animales que sobrepasaron los 30 días se observaron además temblores y paresias de las extremidades. En los pasajes posteriores los síntomas fueron más precoces, desde los 8 días en adelante, y no alcanzaron tanta intensidad.

GRAFICO Nº 1
(Esc. semilogarítmica)
Curvas de Parasitemias de Ratones Inoculados con "Cepa Perú" de
Trypanosoma cruzi.
(Valores obtenidos de grupos de 8 y 10 animales)



- · — · — 1er. traspaso. Dosis de inoc. 80.000 parásitos de dep. de triatomas.
- - - - - 2º traspaso. Dosis de inoc. 100.000 parásitos de sangre de ratones C3H.
- 7º traspaso. Dosis de inoc. 100.000 parásitos de sangre de ratones C3H.

Gráfico Nº 1 : Acción del acetato de cortisona a "dosis alta" y de su vehículo de suspensión sobre la curva de parasitemias de ratas infectadas experimentalmente por **Trypanosoma cruzi.**

Escala semilogarítmica.

En la autopsia llamó la atención una intensa congestión del tejido celular subcutáneo, ganglios y peritoneo, especialmente, y en los animales de mayor sobrevida, el gran volumen alcanzado por el bazo y ganglios. En un animal sacrificado en el segundo traspaso, a los

47 días, el bazo fué el 6% del peso total, siendo en el animal normal de la misma edad, igual a sólo un 0.3%. En este mismo animal, el ganglio inguinal representó un 0,7% del peso y en el control normal sólo fué un 0,01% del peso corporal.

Histología: Hubo grandes diferencias en el curso del parasitismo celular y en la reacción del organismo, en los diferentes traspasos. Para hacer más sencilla la narración de los hechos, se describirán ambos aspectos por separado:

a) Parasitismo celular: En los cinco primeros pasajes se observó que, no obstante ser la inoculación intraperitoneal, los parásitos no permanecieron en esta cavidad, y las células del omento y mesenterio sólo fueron parasitadas en escaso número cuando la infección estaba muy avanzada y había altas parasitemias. Lo mismo ocurrió con el tejido conjuntivo subcutáneo, si bien en este sitio fué más frecuente el hallazgo de nidos de leishmaniodes desde los 6 ó 7 días en adelante. En estos animales, el tejido parasitado de preferencia fué el muscular estriado. En él, desde los 9 días se encontraron nidos cada vez más frecuentes a medida que avanzaba la infección (ver figura N^o 2). Muchos de ellos fueron invadidos por macrófagos, poliblastos y algunos heterófilos, que fagocitaron cierto número de elementos parasitarios.

El miocardio también fué invadido por los parásitos, pero en menor proporción. Se observó en él una levemente mayor preferencia por las auriculillas y la base.

En el bazo, ganglio, hígado y timo fué excepcional el hallazgo de focos de multiplicación parasitaria. Sólo escasas células reticulares o histiocitarias aparecieron parasitadas.

Las células epiteliales de la piel y de los parénquimas renal, pulmonar, cerebral, cerebelar y glandulares no se han encontrado comprometidas. Tampoco lo fueron los macrófagos fijos del pulmón, sistema nervioso central, riñón y médula ósea.

En el sexto traspaso hubo un manifiesto cambio en la distribución del parasitismo tisular: si bien los músculos fueron intensamente afectados, tanto como en los pasajes anteriores en los días correspondientes, hubo, además, una intensa y precoz invasión del tejido conjuntivo, tanto del punto de inoculación como de todo el resto de la economía. Las células parasitadas de preferencia fueron los histiocitos del celular subcutáneo, de los músculos esqueléticos, miocardio y glándulas, como páncreas y suprarenal. En mucho menor grado se encontraron focos de multiplicación en histiocitos y células reticulares del ganglio, bazo y timo y en células de Kupffer. No se encontraron parásitos en los macrófagos fijos del pulmón, sistema nervioso central y médula ósea.

Desde el 7º repique en adelante, predominó el compromiso del tejido conjuntivo. Esta nueva modalidad de infección fué causante de altas parasitemias precoces, pues desde el tercer día aparecieron formas trypanosómicas abundantes, liberadas por el estallido de histiocitos y fibroblastos repletos de parásitos. La muerte de los animales se ha producido desde entonces entre 10 y 12 días, cuando aún los nidos de la fibra muscular estriada y miocárdica son de escaso o regular tamaño.

b) Reacción inflamatoria del organismo: En todos los pasajes se encontró una intensa reacción del organismo. Los hechos más sobresalientes de ella se pueden esquematizar en los siguientes puntos:

1. La presencia de abundantes macrófagos inflamatorios que infiltraron especialmente el peritoneo, tejido celular subcutáneo y músculos esqueléticos. En mucho menor número, se les encontró en el miocardio y en otros órganos. Estos macrófagos aparecieron difusamente distribuidos en los tejidos, pero en algunas oportunidades formaron nódulos alrededor de nidos de leishmanioides, en conjunto con otras células, como poliblastos*, escasos heterófilos y linfocitos pequeños y medianos. La tendencia nodular fué manifiesta en el hígado, músculos esquelético y celular subcutáneo. Cierta número de elementos leishmanioides fueron fagocitados y digeridos por estos macrófagos. Pero a medida que aumentó la virulencia de la cepa, cada vez fué menor la eficacia de este mecanismo de defensa, y se observó multiplicación normal de los parásitos dentro de poliblastos y macrófagos.

Además de los macrófagos inflamatorios, se encontró en el infiltrado celular numerosos poliblastos, linfocitos pequeños, medianos y grandes, plasmazellen y algunos eritroblastos, y en el hígado, fué frecuente el hallazgo de megacariocitos desde los 16 días en adelante.

En cuanto al origen de estos macrófagos, se puede decir que derivaron principalmente de: 1º) movilización y proliferación de histocitos fijos del peritoneo, celular subcutáneo y tejido intersticial de músculo y miocardio; 2º) de movilización y proliferación de las células litorales del hígado, reticulares del bazo y litorales y reticulares de los ganglios; 3º) de la derivación de linfocitos pequeños, medianos y grandes hacia poliblastos y macrófagos inflamatorios. Esta fuente heteroplástica fué especialmente activa en el peritoneo, celular subcutánea y músculo estriado; en el hígado también se encontraron numerosos pequeños focos

(1) Las células inflamatorias están designadas siguiendo la nomenclatura de Maximow.

de proliferación linfocitaria entre las trabéculas hepáticas y marginando los vasos sanguíneos y conductillos biliares.

2. Intensa participación de los órganos linfoides, consistente en: 1º) movilización de pequeños y medianos linfocitos desde los folículos linfáticos del bazo, ganglio y timo, hacia los vasos sanguíneos y linfáticos, claramente visible desde el tercer día; 2º) proliferación de linfocitos medianos y grandes en los folículos linfáticos del bazo, timo y especialmente del ganglio; 3º) transformación de células reticulares en linfocitos grandes; 4º) formación de macrófagos inflamatorios a partir de células reticulares y litorales de estos mismos órganos; 5º) desde los 15 días, en los cinco primeros trasposos, y desde el 6º, en los pasajes posteriores, hubo formación de abundantes plasmazellen en el ganglio y bazo, llegando ellas a constituir la principal riqueza celular de estos órganos; 6º) en el bazo se observó desde los 10 días en adelante, y más precozmente desde el 7º trasposo, franca hiperplasia de la médula roja, observándose en ella activa eritropoyesis que derivó hacia la formación de gran cantidad de plasmazellen.

3. Activa participación del hígado en el proceso inflamatorio. Desde el 6º día se observaron focos inflamatorios de aspecto nodular, de pequeño y regular tamaño, formados por macrófagos, poliblastos, linfocitos pequeños, medianos y a veces grandes, y uno que otro heterófilo. Cuando la cepa hubo alcanzado gran virulencia, fué muy evidente que esta reacción rodeaba leishmanioides de aspecto normal o alterados, y que algunos de ellos eran fagocitados y digeridos por macrófagos y poliblastos.

Hubo una activa movilización de las células litorales, las cuales evolucionaron hacia linfocitos grandes y macrófagos inflamatorios. Estos últimos abandonaron el órgano por los vasos suprahepáticos.

Formando pequeños grupos entre las trabéculas hepáticas, en las márgenes de los capilares sinusoides y alrededor de los vasos y de los conductillos biliares, se observaron linfocitos medianos y grandes en multiplicación.

A veces se encontraron megacariocitos, eritroblastos y mielocitos en las márgenes de los capilares sinusoides, en escaso número.

Todos estos fenómenos corresponden exactamente con los obtenidos al inocular cultivos virulentos de cepa Tulahuén⁸; solamente que su intensidad, en este último caso, fué mucho mayor.

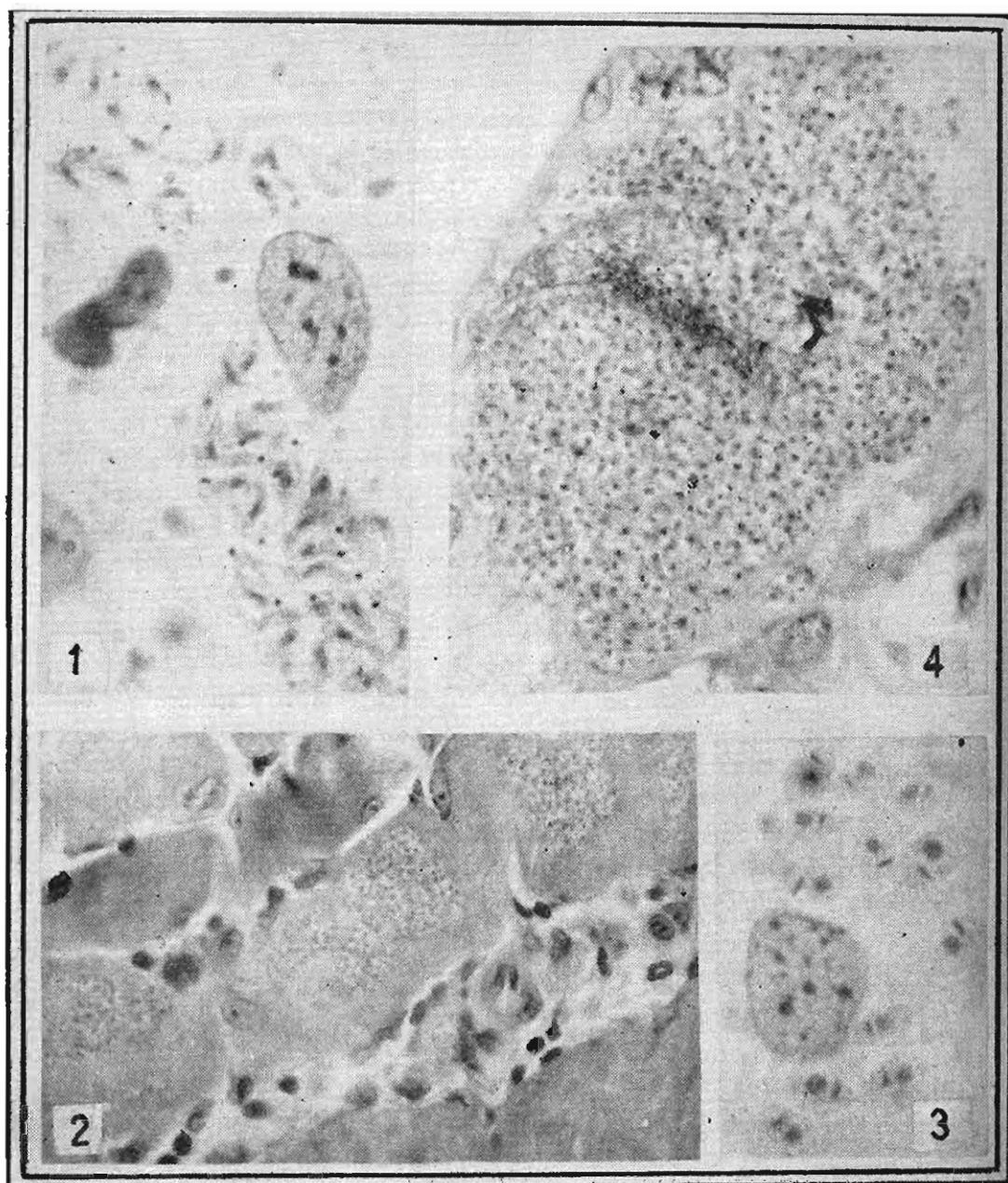


FIG. Nº 1 : Formas tripanosómicas liberadas de un histiocito del tejido celular subcutáneo de ratón, tomado a los cinco días de enfermedad.— FIG. Nº 2 : Nidos parasitarios en fibra muscular estriada. Discreta infiltración inflamatoria en el conectivo intersticial.— FIG. Nº 3 : Formas leishmanioides en histiocito del tejido conjuntivo de ratón a los cinco días de enfermedad.— FIG. Nº 4 : Célula gigante de la placenta de una hembra de ratón, intensamente parasitada.

4. Llamó la atención la escasa o nula participación en el proceso inflamatorio, de los macrófagos fijos del pulmón, células septales, y del sistema nervioso central, microglia.

Curso de la infección en otros animales de laboratorio: En este punto no se relatarán los resultados del estudio histológico, por no estar terminado aún el proceso técnico.

Parasitemias: Hubo una clara diferencia en el curso de la infección sanguínea del hamster, del perrito joven y del cuy.

El hamster fué muy sensible. A dosis altas, de 2.000.000 de trip x 100 g. de peso, todos los animales presentaron abundantes trypanosomas circulantes desde los 4 días en adelante, con numerosas formas delgadas. La muerte de los animales se produjo entre 8 y 10 días, con valores sobre 5.000 elementos por mm³. Dosis menores de 500.000 parásitos por 100 gramos de peso, permitieron mayor sobrevida, hasta 14 días, pero también fué mortal para la totalidad de los animales. En este caso hubo crecidas parasitemias desde los 8 días en adelante. El mayor porcentaje de formas delgadas, 35%, se encontró a los 6 días.

La sensibilidad de los perritos fué muy variable. En general, los valores subieron rápidamente, muriendo los animales entre 10 y 12 días, con parasitemias sobre 6.000 elementos por milímetro cúbico. Algunos animales, sin embargo, los de mayor tamaño y edad, presentaron parasitemias bajas, con muerte entre 16 y 20 días, o sobrevida indefinida. Otras veces se observó una curva alta hasta los 12 ó 14 días, y luego, una caída en crisis, seguida de un nuevo ascenso entre 22 y 25 días. Casi siempre en esta segunda alza se produjo la muerte de los animales.

El cuy, con dosis de 500.000 parásitos por 100 gramos de animal, dominó la enfermedad. Sus parasitemias fueron irregulares y bajas, no superiores a 60 trypanosomas por mm³, y hasta ahora todos los animales han sobrevivido más de tres meses.

Sobrevida: Resumiendo lo dicho en el párrafo anterior, se puede decir que la inoculación de la cepa estudiada de *T. cruzi*, en dosis de 500.000 o más elementos por 100 gramos de peso, fué mortal para el 100% de los hamsters; en los cuyes con una dosis de 500.000 trypanosomas por 100 gramos de peso, hubo una infección muy atenuada con sobrevida aparentemente indefinida, y en el perrito joven, con dosis similares, se produjo la muerte en plazos breves o pasaron a la cronicidad, dependiendo esto de su edad y tamaño.

*Serología**: En los primeros pasajes en ratones se encontraron α -glutininas en bajo título, 1:10, después de los 30 días de infección. Posteriormente, al producirse la muerte entre 10 y 12 días, no se han detectado anticuerpos.

En el cuy y el hamster se encontraron precipitinas y aglutininas desde los 5 días. Los resultados pueden ser vistos en la Tabla N° 2.

T A B L A N° 2

D I A S	5		10		14	
	Precip.	Aglut.	Precip.	Aglut.	Precip.	Aglut.
Hamster	+	1:160	+	1:1280	+	1:640
Cuy	+	1:160	+	1:320	+	1:640

Inoculación de hembras preñadas.

Se realizó con trypanosomas del 7º traspaso, altamente virulentos. Los animales fueron sacrificados a los 10 días de enfermedad por su mal estado general. Hasta ese momento no hubo aborto.

El estudio histológico demostró gran parasitismo de la fibra muscular uterina y de las placentas materna y fetal. Especialmente intenso fué este último, llamando la atención los grandes nidos de leishmonioides y trypanosomas de las células gigantes (ver figura N° 4). Sin embargo, al examen cuidadoso de los tejidos y vasos del embrión, realizado en cortes seriados, no se encontraron parásitos en él*.

*Cultivos**.*

Durante el 8º traspaso se sembró sangre de ratón intensamente positiva en medios de Senekje, sin que se produjera infección agregada, la que había hecho fracasar intentos anteriores. Durante tres repiques, realizados cada 10 días, no se observó multiplicación de los parásitos. Pero a partir de un 4º traspaso aparecieron abundantes elementos citidiformes en activa multiplicación.

(2) Agradecemos la colaboración prestada por la Srta. F. Knierim y el Dr. F. Náquira, quienes realizaron las titulaciones de anticuerpos.

(3) Agradecemos la ayuda del Dr. Orlando Badínez en la interpretación de los cortes histológicos placentarios y fetales.

(4) La siembra y los trasposos de estos cultivos fué realizada por el Sr. Gilberto Cortés.

Actualmente, estos cultivos se encuentran en el 7º traspaso y en ellos hay gran cantidad de criticidias, con numerosas figuras en división y en rosetas, algunos grupos de leishmanioides y muy numerosas formas de trypanosomas metacíclicos.

DISCUSION

De los resultados expuestos se desprende que los trypanosomas presentes en las deposiciones de triatomas capturados en una localidad del Sur del Perú, pertenecían a la especie *Trypanosoma cruzi* y poseían capacidad patógena para numerosos animales de laboratorio.

Especialmente grave es el hecho de que los cuyes y perritos de cierto tamaño hagan una enfermedad atenuada, con larga sobrevivencia, pues estos animales, muy frecuentes en las viviendas rurales de esas regiones, pueden servir de reservorios.

El aislamiento de la cepa, la estabilización de su virulencia en ratones genéticamente homogéneos y la obtención de cultivos, permitirán continuar el estudio de su capacidad patógena y su poder de adaptación en los diferentes mesoneros.

Del estudio realizado hasta ahora al respecto, se puede decir que en las deposiciones de los reduvídeos, que dieron origen a la nueva cepa, existía, seguramente, una población de formas con diferentes virulencia y tropismo. Así, se vió en los primeros pasajes realizados, un compromiso preferente de los músculos esqueléticos, y posteriormente, del tejido conectivo. Este proceso corresponde, probablemente, a una selección de elementos parasitarios que estaban en muy escaso número en un comienzo, pero que, a través de los sucesivos pasajes, se han visto favorecidos por la mayor velocidad del término del ciclo en los nidos de leishmanioides que parasitan los histiocitos y fibroblastos. En cambio, los focos de multiplicación en la fibra muscular pueden alcanzar gran tamaño, demorando en ello mucho más tiempo, sin que se liberen al intersticio formas trypanosómicas. Además, se vió que la capacidad de fagocitar leishmanioides por parte de los macrófagos inflamatorios, era mayor en los primeros traspasos. Actualmente, aun cuando persiste la intensa reacción del organismo, predomina francamente la multiplicación normal de los parásitos dentro de esas células. Aparentemente, han ido desapareciendo los elementos susceptibles a la fagocitosis. Es posible esperar que a medida que transcurran los pasajes de la cepa, la reacción inflamatoria llegue a ser menor, por selección de aquellos parásitos que se adapten mejor a las condiciones del or-

ganismo del mesonero. Es decir, que lleguen a pasar como "desapercibidos" para el huésped, hecho que ocurre en cierto modo con la cepa "Tulahuén"⁶⁻⁷.

Es interesante el hecho de que el ratón, en los primeros trasposos, y el hamster, a pesar de haber formado anticuerpos no líticos, no hayan podido sobreponerse a la invasión parasitaria. Si bien en el caso del ratón se puede argumentar que el título alcanzado fué muy bajo, el hamster presentó tasas superiores al cuy, en el cual se produjo una infección atenuada. Esto podría traducir la escasa importancia de estos anticuerpos como factores favorecedores de la fagocitosis de elementos leishmanioides, proceso éste que, según se ha visto en estudios con cepa "Tulahuén"⁶⁻⁷⁻¹⁴, es el principal medio de defensa del organismo contra la infección chagásica.

Una observación que merece mayor estudio, es la falta de compromiso del embrión, a pesar de la infección aguda y mortal que está sufriendo la madre. De la escasa experiencia actual no se puede aún asegurar que no haya invasión del feto, especialmente si se toma en cuenta la calidad de placenta hemocorial del ratón. Pero es evidente que no hay relación entre el intenso parasitismo placentario y la total indemnidad de las membranas y tejidos fetales, pues ni siquiera hay señales de reacción inflamatoria que pudiera hacer sospechar la presencia de parásitos que no se han logrado encontrar. Aquí se plantea inmediatamente el problema de dónde reside la barrera a estos flagelados y cuáles son los mecanismos que protegen al germen.

CONCLUSIONES

1. Se ha obtenido una nueva cepa de *Trypanosoma cruzi*, a partir de deposiciones de triatomas capturados en una localidad rural del Sur del Perú.
2. Esta cepa, que se ha denominado "Cepa Perú" o "C.P.", se mantiene por pasajes cada 10 días, en ratones C3H y en cultivos en medio de Senekjie.
3. La virulencia de esta cepa se ha logrado mantener alta y constante durante 10 trasposos, repetidos cada 10 días en ratones C3H, con una dosis uniforme de 500.000 parásitos por 100 gramos de peso. La muerte de los animales se produce entre 10 y 12 días, con parasitemias promedios de 8.000 elementos por milímetro cúbico.
4. Además del ratón, ha sido muy sensible a esta cepa el hamster y el perrito de uno a uno y medio meses, los que han muerto entre 10 y 14 días con altas parasitemias.

5. El cuy y el perrito de mayor edad y tamaño, han sido más resistentes, observándose en ellos un tipo crónico de enfermedad, con parasitemias bajas y sobrevida indefinida. Esto los hace especialmente aptos para servir de reservorios parasitarios.

6. La localización histológica de esta cepa fué estudiada en el ratón a través de los sucesivos pasajes. Se observó que en un comienzo el sitio de ubicación preferente de los nidos de leishmanioides fué el tejido muscular estriado. Posteriormente se produjo una precoz e intensa invasión del tejido conjuntivo, que ha desencadenado precozmente altas curvas de parasitemias y muerte de los animales en plazos breves, 10 a 12 días, cuando aún los nidos de la musculatura están de pequeño o regular tamaño.

7. Ha llamado la atención la intensa reacción inflamatoria observada en el organismo del ratón. Sus características principales han sido: a) gran producción de macrófagos inflamatorios, formados a partir de macrófagos fijos y células linfoides, que han infiltrado en forma difusa y a veces formando nódulos, el peritoneo, tejido celular subcutáneo, músculos esqueléticos, miocardio y el conjuntivo de algunas glándulas como páncreas y suprarrenal; b) intensa participación en el proceso inflamatorio de los órganos linfoides: bazo, ganglio y timo, y del hígado.

8. Tanto el ratón, como el hamster y el cuy, formaron anticuerpos no líticos para esta cepa parasitaria. Pero no se observó ninguna relación entre la resistencia a la infección y las tasas de anticuerpos circulantes.

9. En las hembras de ratones preñadas e inoculadas con esta cepa, hubo un intenso parasitismo del útero y placentas materna y fetal. En el embrión, sin embargo, no se encontraron parásitos ni reacción inflamatoria.

RESUMEN

En una localidad del sur del Perú, Putina, se encontraron reduvídeos de la especie *Triatoma infestans*, parasitados por *Trypanosoma cruzi*. En el presente trabajo se describe el aislamiento y estudio de la cepa de *T. cruzi*, obtenida por inoculación de las deposiciones de estos insectos en animales de laboratorio.

Los objetivos enfocados en este primer informe fueron los siguientes:

1. Susceptibilidad de algunos animales de laboratorio, como ratón, hamster, cuy y perrito joven, a esta cepa parasitaria.

2. Estabilización de la virulencia de la cepa.
3. Localización tisular preferente y reacción inflamatoria determinada en el organismo de los huéspedes.
4. Producción de anticuerpos no líticos circulantes.

Resultados:

El ratón, el hamster y el perrito muy joven fueron altamente sensibles a esta cepa parasitaria. Presentaron parasitemias altas precozmente y, cuando la cepa estuvo estabilizada en su virulencia, murió el 100% de los animales entre 10 y 12 días. El cuy y el perrito de mayor edad y tamaño, presentaron enfermedades atenuadas que pasaron a la cronicidad. Esto los hace especialmente aptos para servir de reservorios parasitarios.

2. Después de 6 traspasos en ratones C3H de la misma edad y peso, y empleando siempre la misma vía y dosis de inoculación, se obtuvo una cepa de trypanosomas de alta virulencia que produjo la muerte en el 100% de los ratones entre 10 y 12 días, en todos los pasajes posteriores.

3. En los primeros 5 traspasos hubo una clara preferencia por la localización en el tejido muscular estriado, incluyendo al miocardio. Posteriormente se observó un mayor parasitismo del tejido conectivo. Conjuntamente con esta nueva modalidad, se produjo un incremento precoz de las parasitemias y un notorio aumento de la virulencia. Estos últimos fenómenos se debieron, probablemente, a la existencia de una población de formas de diferente virulencia y tropismo, en las deposiciones de triatomídeos.

En las hembras grávidas se produjo un intenso parasitismo del útero y placentas materna y fetal. En los fetos no se encontraron parásitos ni signos inflamatorios.

La presencia de nidos de leishmanioides se acompañó de intensas manifestaciones inflamatorias. Llamó especialmente la atención, la gran producción de macrófagos inflamatorios a partir de fuentes homo y heteroplásticas.

4. En todas las especies inoculadas con la nueva cepa de *T. cruzi* se pusieron en evidencia anticuerpos no líticos circulantes. Pero no se encontró relación entre la resistencia a la infección del mesonero y la tasa alcanzada por los anticuerpos en la sangre.

SUMMARY

In the village of Putina, Southern Peru, some reduviidae of the species *Triatoma infestans* were found, infested with *Trypanosoma cruzi*. In this paper, the A. describes the isolation and subsequent study of the *T. cruzi* strain, which was obtained by means of inoculating laboratory animals with the faeces of the insect.

The following aims were pursued in this case:

1. Susceptibility of some laboratory animals, such as mouse, hamster, guinea pig and young dogs to this parasitic strain.
2. Stabilization of the virulence of the strain.
3. Most frequent localization of the parasite in the tissues, and inflammatory reaction in the organism of the host.
4. Production of non-lytic circulating antibodies.

The following were the results obtained:

1. Mice, hamsters, and very young dogs were found to be highly sensitive to this parasitic strain. They readily showed high parasitemias, and as soon as the virulence of the strain was stabilized, they all died between the 10th and 12th day after inoculation. Guinea pigs and older and larger dogs suffered from a milder disease which later became chronic. Therefore, they are apt to serve as reservoirs for the parasite in nature.

2. After 6 passages in C3H mice of the same age and weight, using always the same dose and method of inoculation, a highly virulent strain of trypanosomes was obtained which in all passages carried out produced death in 100% of the rats between the 10th and 12th day.

3. During the first 5 passages, most frequent localizations were observed in the striated muscular tissue including myocardium. Later, parasitization was most intense in the connective tissue. This change was accompanied by an early rise in parasitemia and by an enhanced virulence. These facts were probably due to the presence of a population of parasites with different tropism and virulence existing in the faeces of triatomidae.

In pregnant females the uterus and maternal and foetal placentas were intensely parasitized. In the foetuses, however, no parasites nor inflammatory reactions were detected.

The presence of leishmanoid nests was accompanied by intensive inflammatory signs. The high production of inflammatory macrophages derived from homoplastic and heteroplastic sources was particularly noteworthy.

4. In all species inoculated with the new *T. cruzi* strain, non-lytic circulating antibodies appeared. But no correspondence was to be found between the resistance of the host and the rate attained by the antibodies in the blood.

B I O L O G I C A

ZUSAMMENFASSUNG

In der Ortschaft Putina, im südlichen Peru, wurden Reduviidae der Species *Triatoma infestans* aufgefunden, die mit *Trypanosoma cruzi* infiziert waren. In der vorliegenden Arbeit wird die Isolierung und die darauffolgende Untersuchung des *T. cruzi*-Stammes beschrieben. Dieser Stamm wurde durch Inokulierung von Laboratoriumstieren mit Insektenkot gewonnen.

Bei dieser ersten Mitteilung wurden folgende Punkte ins Auge gefasst:

1. Suszeptibilität einiger Laboratoriumstiere, wie Maus, Hamster, Meerschweinchen und junger Hunde, diesem Parasitenstamm gegenüber.
2. Stabilisierung der Virulenz des Stammes.
3. Häufigste Lokalisierung in den Geweben und Entzündungsreaktion im Organismus des Wirtstieres.
4. Bildung nicht-lytischer zirkulierender Antikörper.

Die Ergebnisse waren die folgenden:

1. Maus, Hamster und junge Hunde waren diesem Stamm gegenüber sehr empfänglich. Sie zeigten schon sehr früh hohe Parasitämien und, sowie die Virulenz des Stammes stabilisiert wurde, starben sie zu 100% zwischen dem 10. und 12. Tag. Meerschweinchen und ältere und grössere Hunde zeigten einen mildern Krankheitsverlauf, der später chronisch wurde. Hierdurch werden sie besonders geeignet, um als natürliches Reservoir für die Parasiten zu dienen.

2. Nach 6 Passagen bei C3H Mäusen von gleichem Alter und Gewicht, und unter Benutzung gleicher Inokulationsdosen und -arten, wurden ein Trypanosomenstamm von hoher Virulenz erzielt, der bei den darauffolgenden Passagen die Mäuse zwischen dem 10. und 12. Tag zu 100% tötete.

3. Während der ersten 5 Passagen setzten sich die Parasiten hauptsächlich im quergestreiften Muskelgewebe, einschliesslich Myocardium, fest. Später wurden ein stärkerer Parasitenbefall des Bindegewebes beobachtet, Hierzu trat gleichzeitig ein frühzeitiges Zunehmen der Parasitämie und eine auffallende Steigerung der Virulenz. Diese Erscheinungen

sind wahrscheinlich auf das Vorhandensein einer Population verschiedenartiger Tropismen und Virulenz im Triatomidenkot zurückzuführen.

Bei trächtigen Weibchen waren der Uterus sowie die mütterliche und foetale Placenta stark von Parasiten befallen. Doch bei den Foeten wurden weder Parasiten noch Zeichen der Entzündung aufgefunden.

Das Vorhandensein von Herden leishmanioider Formen fiel zusammen mit starken Entzündungserscheinungen. Auffallen war vor allem die starke Anzahl an Inflammationsmakrophagen sowohl homo- wie heteroplastischen Ursprungs.

4. Bei sämtlichen mit dem neuen *T. cruzi*-Stamm inokulierten Säugetieren traten zirkulierende, nicht-lytische Antikörper auf. Es konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen dem Widerstand gegen Infektionen des Wirtstieres und der Höhe der zirkulierenden Antikörper festgestellt werden.

BIBLIOGRAFIA

- 1.— NAQUIRA, F. y NAQUIRA, N.— Contribución al estudio de la enfermedad de Chagas. Encuesta epidemiológica en el Sur del Perú (Provincia de Tarata, Departamento de Tacna). Bol. Chileno Parasit., **10**: 29-31, 1955.
- 2.— PIZZI, T. y PRAGER, R.— Estabilización de la Virulencia de una cepa de *T. cruzi* por pasaje seriado en ratones de constitución genética uniforme. Análisis cuantitativo del curso de la infección. Biológica, **16-17**: 3-9, 1953.
- 3.— PIZZI, T.; AGOSIN, M.; CHRISTEN, R.; HOECKER, G. y NEGhme, A.— Estudio sobre inmunología de las enfermedades parasitarias. I. Influencia de la constitución genética en la resistencia de las lauchas a la infección experimental por *Trypanosoma cruzi*. Bol. Inf. Parasit. Chilenas, **4**: 48-49, 1949.
- 4.— PIZZI, T.; AGOSIN, M.; CHRISTEN, R.; HOECKER, G. y NEGhme, A.— Influencia de la constitución genética de la laucha en la infección experimental por *Trypanosoma cruzi*. Biológica, **8-11**: 43-53, 1948-1949.
- 5.— LANGERON.— Précis de Microscopie. Masson & Cie., París, 1949. (Pág. 823).
- 6.— PIZZI, T.; RUBIO, M. and KNIERIM, F.— Immunology of Chagas' disease. Riv. Parassitol., **15**: 577-592, 1954.
- 7.— PIZZI, T.; RUBIO, M. y KNIERIM, F.— Contribución al conocimiento de los mecanismos inmunitarios de la enfermedad de Chagas Experimental de la Rata. Bol. Inf. Parasit. Chilenas, **8**: 66-72, 1953.
- 8.— RUBIO, M.— Estudio de los factores que intervienen en la Virulencia de una cepa de *T. cruzi*. Acción de la Cortisona en la capacidad de Invasión y Multiplicación del Parásito. Biológica, **20**: 89-126, 1954.

- 9.— PETERFI, T.— Eine beschleunigt Celloidin-Paraffin-Einbettung mit Nelkenöl oder Methylbenzoat Celloidin. Ztschr. f. wissensch. Mikr., **38**: 342-45. 1921.
- 10.— LILLIE, R. D.— Histopathologic Technic. Philadelphia. The Blakiston Company, 1948. (Pág. 81. Maximow's Hematoxylinazur II eosine).
- 11.— MUNIZ, J.— Do valor da reação de precipitina no diagnostico das formas agudas e sub-agudas da "Doença de Chagas". (Trypanosomiasis americana). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **45**: 537-549, 1947.
- 12.— SENEKJIE, H. A.— Biochemical reactions, cultural characteristics and growth requirements of *Trypanosoma cruzi*. Am. Trop. Med. **23**: 523, 1943.
- 13.— MAXIMOW, A. A. & BLOOM, W.— Textbook of Histology, 5th edition. Philadelphia, W. B. Saunders Co., 1950.
- 14.— RUBIO, M.— Contribución al Estudio de la enfermedad de Chagas: XII. Inmunología de la enfermedad de Chagas Experimental de la Rata. Tesis, Universidad de Chile, 1953).