

TRANSMISION DEL *TRYPANOSOMA CRUZI* EN LOS VERTEBRADOS

Carlos Díaz-Ungria

II. CAMINO QUE SIGUE EL *TRYPANOSOMA* EN EL ORGANISMO DE LOS VERTEBRADOS, CUANDO SE LES CONTAMINA POR VÍA BUCAL

Las vías de entrada para el *Trypanosoma cruzi* en los vertebrados son, naturalmente, varias, pero entre todas ellas consideramos como más frecuentes la vía ocular, la vía bucal y la vía cutánea.

Con respecto a la vía ocular, en el hombre está aceptada como la más frecuente, y se manifiesta clínicamente por el síndrome oftalmo-ganglionar. Hechos experimentales, especialmente en monos, hablan a favor de estos hechos, toda vez que la instilación de trypanosomas en el ojo produce el síndrome y luego la enfermedad, pero será bueno recordar que en general los trypanosomas muestran tropismo por los órganos oculares, y son muchas las especies que producen lesiones en dichos órganos, a pesar de que no se transmiten por dicha vía. Así, en el souma de la India, producida en los caballos por el *T. evansi* se señalan lesiones oculares con equimosis de las conjuntivas. En la enfermedad producida en los perros de la India por el mismo trypanosoma hay conjuntivitis y opacidad de la córnea. En la enfermedad que en el perro produce en Venezuela el *T. venezuelense* hay blefaritis, conjuntivitis y queratitis. En el mal de caderas producido en equinos de Brasil, Paraguay y Argentina por la variedad correspondiente de *T. evansi* hay conjuntivitis y equimosis oculares, además de queratitis intersticial e iritis. En Venezuela, la derrengadera de los caballos producida por el *T.*

venezuelense ocasiona lesiones oculares análogas a las señaladas anteriormente. En la durina del caballo, de transmisión coital, se presenta edema y ulceraciones de la córnea. En la trypanosomiasis bovina por *T. vivax*, tanto en Africa como en América, hay fuerte lagrimeo. En la nagana, producida en los animales domésticos por el *T. brucei*, hay edema ocular con opacidad de la córnea y ceguera. En la enfermedad del sueño, producida en el hombre por el *T. gambiense*, se señala edema sub-orbitario, iritis, ciclitis y corio-retinitis, y en la trypanosomiasis, mucho más grave, que produce en el hombre el *T. rhodesiense*, y en la cual el trypanosoma se multiplica en el miocardio, determinando una miocarditis y pericarditis exudativa, se ha señalado que la inoculación del trypanosoma a la oveja y la cabra produce edemas y queratitis. También hay que recordar que, según diversos autores, además del edema palpebral de origen exógeno, atribuido a la contaminación por heces de *Rhodnius prolixus*, existe otro síndrome análogo, de origen endógeno, que se presenta después de algún tiempo de la contaminación y puede observarse cuando la vía de entrada ha sido otra que la ocular (Talice, 1944). Claro que el síndrome endógeno es más bien un edema facial, que a lo más llega a afectar a los párpados inferiores, pero en todo caso es necesario tenerlo en cuenta a la hora de considerar la puerta de entrada. Por otra parte, en el perro y otros vertebrados no parece probable que la vía ocular sea frecuente, ya que no se dan en ellos las circunstancias necesarias para la contaminación ocular en el hombre (contaminación ocular por los dedos sucios de heces de insectos contaminados). En suma, en el perro y otros vertebrados, la puerta de entrada ocular debe considerarse como de escasa frecuencia.

La contaminación por vía bucal creemos que sería la más común en el perro y otros animales vertebrados, y ya en el trabajo anterior hemos demostrado la facilidad con que se puede reproducir experimentalmente. Los animales se contaminarían, bien lamiendo objetos sucios de heces de *Rhodnius prolixus* infectados o ingiriendo alimentos (leche, etc.) contaminados por las heces de dichos insectos o directamente devorando los insectos, aunque este último caso no parece muy común.

La contaminación por vía cutánea puede considerarse como la tercera en importancia para el hombre y la segunda para el perro y otros animales vertebrados, pues las pruebas de inocu-

lación por escarificación cutánea han resultado siempre positivas, y se puede admitir que los animales se contaminan rascándose.

Partiendo de estas afirmaciones, consideramos que el perro se contamina naturalmente por ingestión de trypanosomas, principalmente contenidos en heces de insectos, y en este trabajo nos hemos propuesto estudiar cuál sería el camino del *Trypanosoma cruzi* después de haber sido ingerido por el perro.

Un punto importante para considerar la infestación del perro por vía bucal sería el de saber cuánto tiempo pueden permanecer los trypanosomas en estado patógeno en las heces de insectos después de emitidas. Teóricamente hemos de admitir la posibilidad de que sobrevivan mientras las heces están húmedas, y hay que tener en cuenta que en los ranchos antihigiénicos en que viven los *Rhodnius prolixus* el estado de humedad de las heces de los mismos puede prolongarse mucho tiempo. Pero son más significativas las experiencias de Wood (1942), quien trabajando con *Triatoma sp.* infectados muertos por el calor o por muerte natural, demostró la supervivencia del *Trypanosoma cruzi* hasta por un mes. Hay que señalar que este autor afirma la posibilidad de contagio de los roedores por la ingestión de triatomídeos infectados. Durante la Convención de la Asovac en Caracas en mayo de 1964, autores argentinos nos comunicaron verbalmente que en la escuela de Mayer habían demostrado la infecciosidad de heces de insectos secas por algún tiempo. Por último, recordamos la comunicación que nos hizo Juan C. Gómez Núñez (1964), quien, tomando ratones blancos, les hizo ingerir *Rhodnius prolixus* infectados, y muertos después de tres días, mantenidos a la temperatura ambiente con resultado positivo. Estos hechos son importantes para la lucha contra la enfermedad de Chagas en el hombre, ya que puede ocurrir que después de una fumigación domiciliaria que haya matado los *Rhodnius prolixus* infectados, la ingestión de éstos por perros, gatos, ratas, etc., permita una mayor expansión posterior del trypanosoma.

Nosotros pensamos que en los casos de contaminación bucal, el trypanosoma atraviesa el tubo digestivo y entra en el organismo del perro a través del intestino. Se plantea el problema de cuál sería la importancia del estómago como barrera que impidiera el paso de los trypanosomas, los cuales teóricamente deben ser atacados por el jugo gástrico que los destruiría. Este es el

punto principal que tratamos de dilucidar en este trabajo, y como información previa a nuestras experiencias encontramos en Bordet, Coulon y Sevestre (1962) un trabajo sobre la duración del tránsito normal de los alimentos por el tubo digestivo del perro. Estos autores utilizaron varias fórmulas de alimentos, y en resumen demostraron radiológicamente que el tiempo de paso es el siguiente :

Esófago : 5 a 20 segundos.

Apertura pilórica : 1 minuto hasta 2 horas.

Fin de la evacuación gástrica : 30 minutos a 4 horas.

El intestino está vacío al cabo de : 5 a 12 horas.

El recto está vacío al cabo de : 24 a 48 horas.

De este trabajo se deduce que el píloro puede estar abierto ya un minuto después de la ingestión, y en ese tiempo se puede admitir que los trypanosomas pasen sin ser atacados por el jugo gástrico, especialmente si se han administrado con leche o si el perro ha ingerido el insecto completo.

Admitiendo, pues, la tesis de que los trypanosomas atraviesan el estómago sin ser destruídos en su totalidad, utilizamos gran parte de los animales que habíamos infectado por vía bucal suministrándoles heces de *Rhodnius prolixus* infectadas mezcladas con leche, y en todos los que nos resultaban positivos en sangre periférica por examen en fresco séparamos diversos órganos, que enviamos a la cátedra de Anatomía Patológica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela, para ser estudiados por los profesores Carlos Rodríguez Cabrera y Enrique Merino E. De todos los resultados que nos han remitido dichos profesores extractamos lo siguiente :

Intestino:

En una rata, sacrificada a los 22 días de la infestación bucal, después de haber sido positiva en examen en fresco de sangre periférica, se encontró discreta eosinofilia en la mucosa.

En otra rata en las mismas condiciones, se encontró discreta eosinofilia en la mucosa.

Hígado:

En un acure, sacrificado a las 24 horas de la infestación bucal, se encontró hepatitis serosa.

En un acure, sacrificado a los 7 días de la infestación bucal, se encontró discreta congestión.

En un ratón, sacrificado a los 20 días de la infestación bucal, se encontró hepatitis intersticial con pequeños focos de degeneración celular y congestión.

En una rata, sacrificada 22 días después de la infestación bucal, habiendo dado trypanosomas en sangre periférica, se encontró discreta congestión centrolobulillar con hepatitis intersticial.

En otra rata en las mismas condiciones, se encontró discreta congestión centrolobulillar con hepatitis intersticial.

En una tercera rata en las mismas condiciones, se encontró degeneración turbia de las células hepáticas y estasis grado I. Esta misma rata mostró al mismo tiempo invasión masiva de leishmanias en el corazón y en células musculares del pulmón.

En un acure, sacrificado a los 22 días después de la infestación bucal, habiendo dado trypanosomas en sangre periférica, se encontró degeneración grasa y hepatitis intersticial.

En un segundo acure en las mismas condiciones se encontró hepatitis intersticial discreta.

En un tercer acure en las mismas circunstancias, se encontró degeneración celular focal y congestión pasiva.

En un perro, sacrificado a los 20 días de la infestación bucal después de haber dado trypanosomas en sangre periférica, se encontró degeneración turbia y focos de degeneración vacuolar. En este mismo animal se encontró una miocarditis intersticial aguda.

En un acure, sacrificado 22 días después de la infestación bucal, habiendo dado trypanosomas en sangre periférica, se encontró degeneración grasa, hepatitis intersticial y focos infiltrativos de probable origen parasitario.

En un perro, sacrificado 36 días después de la infestación bucal, que dio trypanosomas en sangre periférica, se encontró hepatitis I con degeneración turbia hepatocelular. Este mismo perro dio leishmanias en el corazón.

Dos acures sanos, de la misma cría, sobrantes de la prueba y que no habían sido contaminados, dieron el hígado sin lesiones.

Corazón:

En dos oportunidades se encontraron leishmanias en el corazón. La primera, en una rata sacrificada 22 días después de la infestación bucal, la cual mostró invasión masiva del corazón por las leishmanias. La segunda, en un perro sacrificado 36 días después de la infestación bucal, el cual dio leishmanias en el corazón. Ambos animales habían dado trypanosomas en sangre periférica antes de ser sacrificados.

Pulmón:

En la misma rata indicada anteriormente, sacrificada a los 22 días de la infestación bucal, después de haber dado trypanosomas en sangre periférica, se encontró en el pulmón la presencia de leishmanias en las fibras musculares de una arteria de medio calibre.

Como ya estos exámenes histopatológicos nos permitían suponer cuál había sido la ruta seguida por los trypanosomas después de la infestación bucal, decidimos hacer nuevas pruebas de contaminación bucal de modo que los trypanosomas llegaran directamente al intestino. Para ello, practicamos la siguiente experiencia:

El día 21 de abril de 1964 tomamos tres cachorros de perro de seis semanas de edad, y los alimentamos con cápsulas de gelatina en las cuales pusimos heces positivas de *Rhodnius prolixus* capturados en un rancho del Estado Aragua, mezcladas con suero fisiológico, introduciendo las cápsulas en el fondo de la boca para que fueran tragadas sin deterioro. El día 21 de mayo obtuvimos resultado positivo al examinar la sangre periférica, o sea un mes después de la infestación bucal, con la novedad de que la cantidad de trypanosomas era mucho mayor de lo acostumbrado, pues en nuestras pruebas anteriores, cuando alimentamos a los animales con leche contaminada con heces positivas de insectos, examinábamos dos gotas de sangre cada vez, y solamente encontrábamos un trypanosoma en una de las dos gotas, siendo la otra siempre negativa, mientras que en esta nueva prueba todas las gotas examinadas mostraban numerosos trypanosomas en cada muestra.

Este resultado nos llevó al intento de contar los trypanosomas, es decir, a hacer un cálculo del número de trypanosomas por mm. cúbico de sangre, y para ello tomamos una cámara he-

matimétrica de Neubauer, y haciendo una dilución de sangre periférica del perro en suero fisiológico a la concentración de 1:20 en la pipeta cuentaglobulos para glóbulos blancos, llenamos uno de los espacios de la cámara. De esta manera disponíamos de un volumen a examinar determinado por la longitud, la anchura y la altura del depósito de sangre. La longitud y la anchura las medimos con ayuda de un ocular micrométrico y resultó ser de 14,5 mm. y 7 mm., respectivamente, lo que multiplicado por la altura de 0,1 mm. (dato de fabricación de la cámara), nos daba un volumen total de 10 mm. cúbicos de la dilución de sangre. Despreciando el retículo graduado, contamos los trypanosomas en todo el volumen de la dilución y resultaron las siguientes cifras:

Perro n.º 1. Se contaron 2 trypanosomas.

Perro n.º 2. Se contaron 25 trypanosomas.

Perro n.º 3. Se contaron 8 trypanosomas.

Un sencillo cálculo matemático nos dio que, para el perro n.º 1, si en 10 mm. cúbicos habíamos contado 2 trypanosomas, en 1 mm. cúbico había 0,2, lo que multiplicado por 20, que es la dilución, nos dio una cifra final de 4 trypanosomas por mm. cúbico de sangre periférica.

En el perro n.º 2, por el mismo procedimiento, obtuvimos una cifra final de 50 trypanosomas por mm. cúbico de sangre.

En el perro n.º 3, obtuvimos una cifra final de 16 trypanosomas por mm. cúbico de sangre.

Estas cifras las damos con alguna reserva, ya que no sabemos si la superficie de la cámara era micrométricamente exacta en toda su extensión, pero de todos modos nos dan un valor muy próximo a la realidad. En el futuro pensamos emplear cámaras más adaptadas a este trabajo, como la de Nageotte, que ya nos ha resultado de gran utilidad con el *Trypanosoma venezuelense*.

No hicimos el recuento por centrifugación de acuerdo con las viejas experiencias de Simons (1947), señaladas por Langeron (1949). Simons afirma que en la centrifugación y en la triple centrifugación quedan numerosos trypanosomas en el líquido sobrenadante, y que hasta después de una hora de centrifugación de 3.000 r. p. m. los parásitos resisten la fuerza y

quedan en el líquido. Nosotros hemos comprobado un hecho similar centrifugando sangre de caballo con *Trypanosoma venezuelense*, y después hemos encontrado gran cantidad de trypanosomas en el líquido sobrenadante.

COMENTARIOS

El resultado positivo obtenido por la ingestión de cápsulas de gelatina conteniendo *Trypanosoma cruzi* nos demuestra el paso del trypanosoma a través de la mucosa intestinal, y si comparamos los resultados de las pruebas con leche y las pruebas con cápsulas llegamos a la conclusión de que el estómago representa un obstáculo para el paso de los trypanosomas, destruyendo gran parte de ellos, pero otra parte es capaz de sobrepasar esta barrera, llegando al intestino.

Los casos de eosinofilia de la mucosa intestinal en dos ratas contaminadas por vía bucal permiten afirmar que se trata de una huella dejada por el paso de los trypanosomas. Hay que señalar que estas ratas no tenían ningún parásito intestinal.

La uniformidad del hallazgo de lesiones de hepatitis intersticial en perros, acures y ratas contaminadas por vía bucal nos permite suponer que, después de atravesar el intestino, los trypanosomas se localizan en el hígado, donde se debe desarrollar el foco primario. Esta tesis la confirma la falta de lesiones hepáticas en los acures del mismo lote no infestados.

Los hallazgos de leishmanias en el corazón de dos perros y una rata infestados por vía bucal permite mantener el hecho conocido de que el trypanosoma constituye su localización definitiva en la musculatura, preferentemente en la cardíaca. Los trypanosomas pasarían del hígado a la circulación general, para distribuirse según su tropismo. El hallazgo en una rata de leishmanias en las células musculares del pulmón nos muestra otro foco secundario que tendría la misma evolución que los focos cardíacos.

CONCLUSIONES

1.° El perro es capaz de adquirir la enfermedad de Chagas por ingestión de heces de *Rhodnius prolixus* contaminadas.

2.° Los trypanosomas son capaces de seguir la vía digestiva y atravesar el estómago para llegar al intestino.

3.° Los trypanosomas atraviesan el intestino, para caer en la circulación del sistema porta.

4.° Llegados los trypanosomas al hígado, constituyen el foco primario, causando lesiones de hepatitis intersticial.

5.° Del hígado, y después de la evolución del foco primario, los trypanosomas caen a la sangre, para distribuirse por el organismo y localizarse en la musculatura, especialmente la cardíaca.

III. LA «PRUEBA DEL CHIPO» Y SU UTILIZACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO Y LA EXPERIMENTACIÓN DE LAS TRYPANOSOMIASIS

Las pruebas que vamos a relatar en este trabajo se refieren al *Trypanosoma venezuelense* y al *Trypanosoma cruzi*, y creemos haber hallado una técnica de trabajo de innumerables consecuencias, tanto teóricas como prácticas.

Estos estudios se realizaron en el Laboratorio del Centro Experimental de Estudios Superiores de Barquisimeto en el primer semestre de 1965. Con el autor colaboraron: el Dr. Manuel Felipe Gallardo Zepa, las Bionalistas Srta. Rafaela Torres Artigas y Sra. Josefina de Vicari, y el Dr. M. Salvador Yépez.

Tratando de dar la mayor claridad a nuestra exposición, relataremos por separado las experiencias hechas con cada trypanosoma, aunque en realidad todos los estudios fueron simultáneos.

Trypanosoma venezuelense:

Para establecer nuestra cepa de investigación y de docencia partimos de dos acures inoculados en el C. I. V. de Maracay con una cepa que llevaba 20 años pasada por acure y que en abril de 1964 había sufrido un pase por caballo y otro por perro.

Los acures inoculados eran fuertemente positivos en sangre periférica el 10 de marzo (o sea 18 días después de la inocula-

ción) y el 11 de marzo los sacrificamos para obtener sangre cardíaca y proceder a inocular otro lote de acures, utilizando la vía intraperitoneal y la dosis de 0,5 cc. por animal. Estos acures reaccionaron de modo irregular, pues mientras algunos eran progresivamente positivos hasta la muerte, otros morían prematuramente por causa desconocida y otros presentaban una positividad muy débil, que alternaba con días negativos, sin que se pudiera pensar en crisis trypanolítica, sino más bien en infecciones muy débiles.

El día 5 de abril (o sea 25 días después de la inoculación) realizamos las dos pruebas siguientes:

1.º Prueba del chipo para diagnóstico:

El acure n.º 4, del lote 2, venía siendo débilmente positivo (uno o dos trypanosomas por preparación de sangre periférica de la oreja), y el día 5 de abril era negativo en sangre periférica, empleando dos gotas de sangre para el examen. Entonces tomamos 3 ninfas de *Rhodnius prolixus* que habían sido sometidas a ayuno prolongado y las colocamos sobre el acure, llenándose por completo. Inmediatamente sacrificamos uno de los insectos y examinamos la sangre contenida en el estómago, encontrándola fuertemente positiva a trypanosomas. Otro de los insectos lo examinamos una hora después, con el mismo resultado. El tercer insecto, examinado 24 horas más tarde, fue negativo. Los chipos usados en esta y las demás pruebas nos fueron cedidos gentilmente por el Dr. José C. Jiménez, de la Unidad Sanitaria de Barquisimeto, y en nuestro laboratorio se sometían a ayuno sin recibir ninguna alimentación.

A partir de esta prueba se volvió rutinario para nosotros realizar la prueba del chipo en todos los casos en que la sangre era negativa, y así en el lote 7, del que hablamos después, seguimos comprobando que en muchas oportunidades la prueba del chipo era positiva antes que la sangre, que siempre era más positiva que la sangre (cuando la sangre era positiva) y nunca se nos dio el caso de sangre positiva y prueba del chipo negativa. Iguales conclusiones nos suministró el lote 8.

Con objeto de tener mayor margen para el estudio de la prueba del chipo, hemos tratado de alargar el período de incubación, que en los ratones y para el *T. venezuelense* es siempre tan corto (24 a 72 horas) que resulta poco manejable. Con esa

finalidad inoculamos el día 3-7-1965 el lote 8, formado por 20 ratones, que recibieron sangre del estómago de chipos alimentados sobre un ratón del lote 7. El inóculo se formó añadiendo 1 c. c. de suero fisiológico estéril por cada chipo, y al examinarlo al microscopio resultó positivo (+ +). La dosis fue de 0,05 c. c. y la vía sub-cutánea. De los 20 ratones, a las 48 horas estaban positivos en chipo 4. Como se ve, la incubación tan corta no permite llegar a conclusiones. Con el mismo objeto el día 9 de julio de 1965 inoculamos el lote 8 bis, formado por 8 ratones, que recibieron sangre de un chipo alimentado sobre un acure positivo a *T. venezuelense*, diluyendo la sangre hasta que se veía menos de un trypanosoma por campo (a 400 aumentos), y de este inóculo diluido inoculamos 0,05 c. c. a cada ratón por la vía subcutánea; sistemáticamente hicimos a todos los ratones a diario el examen de sangre de la cola y la prueba del chipo, expresando en el cuadro siguiente los resultados positivos.

CUADRO 2

	10 d.	11 d.	12 d.	13 d.	14 d.	15 d.	16 d.	17 d.
Ratón 56	Ch	S.						
Ratón 58			Ch.		S.			
Ratón 59	Ch.	S.						
Ratón 63	Ch.		Ch.		Ch.			S.
Ratón 66				Ch.	S.			
Ratón 67			Ch.		S.			
Ratón 71		Ch.	Ch.		Ch.		S.	
Ratón 73		Ch.	S.					

S. = + en sangre.

Ch. = + en chipo

2.º Prueba del chipo para inoculación.

El acure n.º 5, del lote 2, que era fuertemente positivo, fue sometido a la prueba del chipo con varios insectos, los cuales examinados inmediatamente mostraron gran cantidad de trypanosomas. Esta sangre sacada del estómago del insecto fue

inoculada a un perro. (1 c. c. intraperitoneal) y a 3 acures (0,5 c. c. intraperitoneal), y tanto el perro como los acures fueron positivos a los 15 días, muriendo los acures 20 días después de la inoculación y el perro un mes después de la inoculación.

Esta prueba la repetimos en el lote 5, tomando sangre del estómago de un *Rhodnius prolixus* que se había alimentado sobre ratón positivo, y la inoculación de la sangre del insecto a dos acures (a la dosis de 0,2 c. c. vía intraperitoneal) resultó positiva 1 mes después, muriendo los animales 42 días después de inoculados.

Nuevamente hemos repetido la prueba el día 28-6-1965 con el lote 7, formado por 3 acures y 6 ratones, los cuales recibieron sangre del estómago de un *Rhodnius prolixus* que se había alimentado sobre un ratón (n.º 26) fuertemente positivo y en estado preagónico, siendo la dosis de 0,1 c. c. de la sangre del estómago y la vía intraperitoneal. Todos los animales inoculados resultaron positivos.

Estos resultados nos animaron a hacer las mismas experiencias con *Trypanosoma cruzi*, en el que, teóricamente, el uso del *Rhodnius prolixus* estaba especialmente indicado.

Trypanosoma cruzi

Para establecer nuestras cepas de trabajo partimos de un tubo de cultivo que nos fue cedido gentilmente por el Dr. Maekelt, del Instituto de Medicina Tropical de la Universidad Central de Venezuela. Esta cepa la venimos manteniendo sin interrupción en cultivos NNN.

Con esta cepa hemos inoculado tres lotes de ratones blancos, siempre a la dosis de 0,2 c. c. vía intraperitoneal, obteniendo los siguientes resultados:

Lote 1.º.

Formado por 4 ratones, que se inoculan el día 4-3-1965 por vía intraperitoneal con 0,2 c. c. de cultivo.

El día 29-3-1965 (25 días de incubación) es débilmente positivo (+) el ratón 1 y negativos los demás. La observación la hacíamos en sangre tomada de la punta de la cola y mezclada con suero fisiológico estéril.

A los 30 días de incubación es negativo el ratón 1 y son positivos los demás en sangre de la cola.

33 días de incubación. Son todos positivos, pero el ratón 1 es muy débilmente positivo, pues solamente hemos contado un trypanosoma en la preparación de sangre, entonces le hacemos la prueba del chipo y en la preparación de sangre tomada del estómago del chipo contamos 20 trypanosomas. La prueba del chipo la hacemos en los ratones anestesiándoles con éter y sujetándoles por las patas en un rejilla, de modo que los ratones quedan con el dorso contra la rejilla, y entonces se invierte ésta y se apoya el abdomen de los ratones sobre el frasco donde están las ninfas de *Rhodnius prolixus* sometidas previamente a ayuno.

Para saber cuánto tiempo puede ser útil la prueba del chipo hacemos la siguiente experiencia; hacemos la prueba del chipo en el ratón 1, que era muy débil positivo en sangre y usamos tres ninfas de *Rhodnius prolixus* sometidas a ayuno previo prolongado. Examinado inmediatamente el primer chipo resultó positivo fuertemente (+ + +). Una hora después, el segundo chipo resultó igualmente positivo (+ + +). El tercer chipo se examinó 24 horas después con resultado negativo.

34 días. La situación es igual que el día anterior. Hacemos al ratón 1 la prueba del chipo y obtenemos 7 trypanosomas en la preparación del chipo, mientras en la de sangre de la cola del ratón habíamos contado 6.

48 días. Son positivos en sangre de la cola los ratones 1, 2 y 4. El ratón 3, que había sido negativo en sangre de la cola, fue sometido a la prueba del chipo, siendo positivo (+ +).

54 días. Se repite la situación del examen anterior. El ratón 3 es negativo en sangre de la cola y positivo (+) en la prueba del chipo.

56 días. El ratón 1 está negativo en sangre de la cola y positivo (+) en la prueba del chipo. Los demás son positivos y el ratón 3 es positivo (+), tanto en sangre como en la prueba del chipo, observando 2 trypanosomas en la sangre y 3 en el chipo.

60 días. El ratón 1 es negativo, tanto en sangre como en la prueba del chipo; los demás son positivos.

68 días. Los ratones 1 y 2 son negativos en sangre y positivos (+ +) en el chipo.

72 días. Todos los ratones son negativos en sangre y todos resultan positivos (+) en chipo.

78 días. Todos los ratones son negativos en sangre. Los ra-

tones 1 y 3 siguen negativos en chipo y los ratones 2 y 4 son positivos (+) en chipo.

86 días. Todos los ratones son positivos en sangre de la cola.

98 días. Todos los ratones son positivos en sangre de la cola.

120 días. Sigue el mismo resultado.

126 días. Todos los ratones son negativos tanto en sangre como en la prueba del chipo.

134 días. Todos los ratones fueron negativos en sangre. El ratón 1 fue negativo también en chipo. Los ratones 2, 3 y 4 fueron positivos en chipo.

Todo este proceso se resume en el cuadro n.º 3.

Lote 2.º.

Formado por 3 ratones, que se inoculan el día 3-4-1965 con sangre tomada del estómago de un *Rhodnius prolixus* inmediatamente después de llenarse sobre el ratón n.º 3 de la prueba anterior, que ese día estaba fuertemente positivo (+++).

18 días. El ratón 6 era positivo (++) en sangre de la cola, y los otros dos negativos. Se hizo la prueba del chipo al ratón 7, resultando negativa.

19 días. La misma situación del día anterior. Hecha la prueba del chipo al ratón 8, que resultó positiva.

20 días. Los tres ratones fueron examinados en sangre de la cola y en la prueba del chipo, con los siguientes resultados: ratón 6, tenía 7 trypanosomas por preparación de sangre de la cola y 20 trypanosomas por preparación de sangre del estómago de chipo; ratón 7, tenía 2 trypanosomas en sangre y 12 en chipo; ratón 8, era negativo en sangre de la cola y positivo (+) en chipo.

23 días. Se examinó solamente el ratón 8, que fue por primera vez positivo en sangre, con 2 trypanosomas por preparación, y en la prueba del chipo presentó 16 trypanosomas por preparación.

30 días. Todos fueron positivos, en sangre de la cola.

38 días. Los ratones 6 y 7 son positivos en sangre. El ratón 8 es negativo en sangre y positivo (++) en chipo.

46 días. El ratón 6 es positivo en sangre. Los ratones 6 y 7 son negativos en sangre y positivos (+) en chipo.

52 días. Los ratones 7 y 8 son positivos en sangre. El ra-

CUADRO 3

Inoculación	11 D	18 d.	22 d.	25 d.	30 d.	33 d.	34 d.	48 d.	54 d.	56 d.	60 d.	68 d.	72 d.	78 d.	86 d.	98 d.	120 d.	126 d.	134 d.
Ratón 1	- S	- S	- S	+ S	- S	+ S + Ch	+ S + Ch	++ S	+ S	- S + Ch	- S - Ch	- S ++ Ch	- S + Ch	- S - Ch	+ S	+ S	+ S	- S - Ch	- S - Ch
Ratón 2	- S	- S	- S	+ S	+ S	++ S	++ S	++ S	+ S	+ S	++ S	- S ++ Ch	- S + Ch	- S - Ch	+ S	+ S	+ S	- S - Ch	- S + Ch
Ratón 3	- S	- S	- S	- S	+++ S	++ S	+ S	- S ++ Ch	- S + Ch	+ S + Ch	++ S	+ S	- S + Ch	- S - Ch	+ S	+ S	+ S	- S - Ch	- S + Ch
Ratón 4	- S	- S	- S	- S	++ S	++ S	++ S	++ S	+ S	+ S	++ S	+ S	- S + Ch	- S + Ch	+ S	+ S	+ S	- S - Ch	- S + Ch

CUADRO 4

Inoculación	18 d.	19 d.	20 d.	23 d.	30 d.	38 d.	46 d.	52 d.	61 d.	68 d.	72 d.	90 d.
Ratón 6	++ S	+ S	++ S +++ Ch		++ S	+ S	+ S	- S + Ch				
Ratón 7	- S - Ch	- S	+ S ++ Ch		+ S	+ S	- S + Ch	+ S	- S + Ch	- S + Ch	- S + Ch	+ S
Ratón 8	- S	- S + Ch	- S + Ch	+ S + Ch	+ S	- S ++ Ch	- S + Ch	+ S	- S - Ch	- S - Ch	- S + Ch	+ S

tón 6 es negativo en sangre y positivo (+) en chipo, pero este ratón muere a consecuencia de la anestesia.

61 días. Los ratones 7 y 8 son negativos en sangre. En chipo es negativo el ratón 8 y positivo (+) el ratón 7.

68 días. Se repite exactamente la situación del examen anterior.

72 días. Para saber durante cuánto tiempo puede ser útil la prueba del chipo hacemos la siguiente experiencia :

Tomamos 4 ninfas de *Rhodnius prolixus* sometidos a previo ayuno y las alimentamos sobre el ratón 7. Inmediatamente después de haberse llenado examinamos el chipo n.º 1 y lo encontramos positivo (+). Una hora después examinamos el chipo n.º 2 y lo encontramos positivo (+). Cinco horas después examinamos el chipo n.º 3 y lo encontramos positivo (+). Seis horas después examinamos el chipo n.º 4 y lo encontramos negativo.

Esa prueba nos demuestra que la prueba del chipo tiene un margen de utilidad de por lo menos cinco horas. Estudios con mayor número de chipos nos indicarán si el margen puede ser aún mayor.

Todo este proceso se expresa en el cuadro n.º 4.

Lote 3.º.

Formado por 4 ratones que se inoculan el día 21-6-1965 por vía intraperitoneal con 0,2 c. c. de cultivo de la cepa de *Trypanosoma cruzi*.

11 días. A los 11 días de la inoculación es positivo (+) en sangre el ratón 9 y negativos los demás. Practicada la prueba del chipo es positivo (+) el n.º 9 y es positivo (++) el n.º 10, siendo negativos los n.º 11 y 13.

17 días. Todos los ratones son negativos en sangre.

25 días. Todos los ratones son negativos en sangre. Los ratones 9 y 10 son positivos en chipo. Los ratones 11 y 13 son negativos también en chipo.

32 días. El ratón 3 es positivo en chipo y negativo en sangre. Los demás son negativos en sangre, y en chipo.

35 días. Los ratones 9 y 13 son positivos en chipos y negativos en sangre. Los demás son negativos en sangre y en chipos.

36 días. Hubo igual resultado que el día anterior.

37 días. Son positivos en sangre el 9, 10 y 13 y positivos en chipos 10 y 11. El ratón 11 sigue negativo en sangre.

El ratón 11 se examina diariamente en sangre, siendo negativo los días 38, 39, 40, 42, 43 y 44 (el día 44 también es negativo en chipo), y 45.

46 días. Los ratones 9, 10 y 13 son positivos en sangre. El ratón 11 sigue negativo.

Como se ve, el ratón 11 nos ofrece un solo resultado positivo en chipo, habiendo sido después sistemáticamente negativo en chipo y en sangre.

Este proceso se expresa en el cuadro n.º 5.

CUADRO 5

		11 d.	25 d.	32 d.	35 d.	36 d.	37 d.	44 d.	46 d.
Ratón 9	Sangre.	+	—	—	—	—	+		+
	Chipo	+	+	—	+	+			
Ratón 10	Sangre	—	—	—	—	—	+		+
	Chipo	++	+	—	—	—	+		
Ratón 11	Sangre	—	—	—	—	—	—	—	—
	Chipo	—	—	—	—	—	+	—	
Ratón 12	Sangre	—	—	—	—	—	+		+
	Chipo	—	—	÷	+	+			

Lote n.º 4.º.

Hemos hecho esta prueba en dos perros utilizados para la experiencia, que relatamos en el capítulo siguiente con este resultado :

Los perros se alimentaron el día 31-5-1965. Fueron negativos en sangre los días 16 de junio, 23 de junio y 28 de junio, y este último día, realizada la prueba del chipo, resultó positiva.

Esta prueba se expresa en el cuadro n.º 6.

Conclusiones:

De las experiencias expuestas se deduce que la prueba del chipo constituye un método de diagnóstico más seguro que el

CUADRO 6

	31-5-65	16-6-65	23-6-65	28-6-65
Perro 1	Inoculo	S —	S —	S — Ch +
Perro 2	Inoculo	S —	S —	S — Ch +
Perro 3	Testigo	S —	S —	S — Ch —
Perro 4	Testigo	S —	S —	S — Ch —

examen directo de sangre fresca en los animales de experimentación inoculados con *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma venezuelense*. En varios casos la prueba del chipo fue más precoz que el examen de sangre. Nuestros hechos experimentales demuestran que la prueba del chipo tiene una efectividad de por lo menos cinco horas. Nosotros creemos que la razón por la cual la prueba del chipo es más positiva que el examen de sangre sería que los *Rhodnius prolixus* introducen su aparato bucal en la intimidad de los tejidos, absorbiendo sangre capilar, o quizá sangre lacunar, mientras que las punciones para estudio de sangre dan sangre procedente de vasos ya de cierto calibre. Esto parecería indicar que cuando los trypanosomas no se encuentran en la sangre periférica es por hallarse refugiados en la red capilar del organismo, así como en la sangre lacunar.

El uso de la prueba del chipo para extraer sangre de animales positivos e inocular la sangre del estómago del chipo en nuevos animales, constituye un método excelente y libre de riesgos para los pases por animales de la cepas *T. cruzi* y *T. venezuelense*, con la ventaja de dejar vivos a los donantes, que pueden seguir en estudio.

IV. PAPEL DE LA MOSCA DOMÉSTICA EN LA TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Antecedentes bibliográficos

Los autores a quienes debemos las ideas que nos llevaron a desarrollar esta experiencia son Vergani y Mayer, por lo cual vamos a exponer previamente estos antecedentes, que consideramos poco conocidos, ya que ninguno de los trabajos a que nos referimos alcanzó entre nosotros la difusión que merecían.

En 1912, Darling, en Panamá, demuestra la intervención de la *Musca domestica* en la transmisión de las trypanosomiasis al demostrar que era capaz de transportar en su trompa el *Trypanosoma hippicum*.

En 1934, Thomson y Lamborn, en la parte de su trabajo en que estudian la vección del *Trypanosoma brucei* por la *Musca spectanda*, demuestran la patogenicidad de las heces de las moscas alimentadas con sangre infectada de trypanosomas.

En 1952, Vergani recoge los trabajos anteriores y decide repetirlos en material venezolano, utilizando para ello *Trypanosoma venezuelense* y *Trypanosoma cruzi*, y como transmisores *Musca domestica* y *Gallitrota macellaria*. Su trabajo está lleno de experiencias valiosas y de datos de interés, entre los cuales vamos a extraer los que se refieren a la *Musca domestica* y al *Trypanosoma cruzi*. Vergani estudia la transmisión por el aparato bucal y por las heces de las moscas, y solamente vamos a relatar las experiencias con heces. En sus pruebas de inoculación de heces de moscas que se habían alimentado sobre sangre de acure positivos a *T. cruzi* dice Vergani lo siguiente :

«Las observaciones microscópicas de las heces en este caso, así como las del contenido intestinal de los insectos disecados, no nos permitieron obtener conclusiones por ser los trypanosomas muy escasos, y tuvimos pocas probabilidades de verlos en el campo microscópico. De todos modos, con el objeto de comprobar hasta cuando el *Schizotrypanum cruzi* podía vivir en el intestino de la mosca doméstica, se inocularon ratones con el mismo contenido intestinal de los insectos disecados, obteniendo resultados positivos hasta ocho horas después de la infección de las moscas.

«Inoculando las heces en el momento de la recolección, y haciendo ésta a diferentes distancias de tiempo de la infección de los insectos, se llevaron a cabo los siguientes ensayos.

«*Primer ensayo*: Se lograron recolectar dieciséis muestras de heces emitidas entre cinco minutos y una hora después de la infección de los insectos, con los cuales se inocularon respectivamente dieciséis ratones, obteniendo doce positivos.

«*Segundo ensayo*: Se lograron recolectar dieciocho muestras de heces, emitidas entre una y dos horas después de la infección de los insectos, inoculando el mismo número de ratones para obtener diez positivos.

«*Tercer ensayo*: Se recolectaron veintidós muestras de heces emitidas entre dos y tres horas después de la infección de los insectos. De los veintidós ratones inoculados se obtuvieron cuatro positivos, el último de ellos el inoculado a las dos horas y cuarenta y cinco minutos.

«*Cuarto ensayo*: Se recolectaron nueve muestras de heces emitidas entre tres y cuatro horas después de la infección de los insectos. No se obtuvo ningún resultado positivo en los nueve ratones inoculados.

«*Quinto ensayo*: Se lograron cuatro muestras de heces emitidas entre cuatro y cinco horas después de la infección de los insectos. Las inoculaciones de las mismas fueron negativas.

«*Sexto ensayo*: Se recolectaron cinco muestras de heces emitidas entre cuatro y cinco horas después de la infección de los insectos. Las inoculaciones de las mismas fueron negativas.

«*Sexto ensayo*: Se recolectaron cinco muestras de heces emitidas entre cinco y seis horas después de la infección de los insectos. Los cinco ratones inoculados dieron resultado negativo».

Y es muy interesante, por su gran sentido profético, copiar la última parte del trabajo de Vergani, que dice lo siguiente :

«Es un hecho comprobado que los trypanosomas pueden penetrar en el organismo animal a través de las mucosas y también de la piel húmeda, como afirma Brumpt. Por lo tanto, es nuestra intención hacer un estudio comparativo de la propiedad de penetración en las distintas mucosas de los trypanosomas por nosotros ensayados, el *Trypanosoma venezuelense* y el *Schizotrypanum cruzi*. Por el hecho de que los dípteros no vulnerantes se encuentran constantemente alrededor de las mucosas, tanto de los animales como del hombre, es un dato de importancia esta-

blecer si dichos insectos, chupando de una solución de continuidad de la piel trypanosomas y depositándolos con sus heces sobre las mucosas, pueden transmitir una tripanosomiasis. Desde este momento podemos adelantar en esta nota un primer resultado positivo, pues con heces de *Musca domestica* infectada de *Schizotrypanum cruzi*, hemos contaminado la mucosa ocular de cuarenta y siete ratones, y de éstos uno resultó positivo. Se trata de un solo resultado entre cuarenta y siete, por lo que por el momento no nos permitimos sacar conclusiones».

El otro trabajo a que nos hemos referido es el de Mayer (1961), del que ya hemos dado cuenta en la parte I de nuestro trabajo, pero en esta oportunidad será bueno recordar que Mayer demostró la transmisión bucal, confirmada plenamente por nosotros. En su trabajo, Mayer expone su teoría sobre el mecanismo de transmisión de la enfermedad de Chagas, con las siguientes palabras:

«Nosotros comprobamos que la leche puede vehicular los trypanosomas metacíclicos; la contaminación por heces de triatominos es frecuente, es bien conocida la costumbre de las vinchuas de deyectar desde los techos, generalmente de paja, que le sirven de albergue. Biberones, vasos, mesas y otros utensilios de cocina pueden ser contaminados y crear la gran posibilidad de infección por ruta digestiva.

«La picadura del insecto es poco dolorosa y provoca una picazón local; es un hecho ya revelado por otros investigadores, que el hombre puede hacer su infección si después de rascarse lleva sus dedos contaminados a la mucosa bucal.

«Podemos decir que en perros y gatos, la más importante puerta de entrada es la mucosa digestiva, sea ésta por la ingestión de alimentos contaminados o por el acto de lamer y deglutir las deyecciones depositadas en su cuerpo.»

Hipótesis de trabajo

A la vista de los trabajos anteriormente citados, y después de nuestras propias experiencias sobre contaminación bucal con resultados positivos del 100 por 100, resultaba evidente que había que revisar los conceptos clásicamente admitidos en relación con la manera de adquirir la enfermedad de Chagas los vertebrados, y muy especialmente el hombre. A nosotros no nos parece muy verosímil la afirmación, tan sostenida por los autores más

ilustres, de que el hombre se contamina llevándose a los ojos los dedos sucios de heces de *Rhodnius prolixus*, y sospechábamos que eso mismo podría ocurrir con heces de *Musca domestica*, de modo análogo a los ratones infectados por Vergani por vía ocular usando heces de moscas. Pero si además las moscas pueden vehicular el trypanosoma y contenerlo en forma patógena en sus heces es indudablemente más probable que el hombre y los vertebrados en general se contaminen por ingestión de heces de moscas, ya sea que el insecto las deposite en la piel del vertebrado o las deje caer sobre alimentos (leche especialmente). Esta hipótesis fue expuesta por nosotros durante nuestra exposición en el Congreso Mundial de Parasitología celebrado en Roma en septiembre de 1964, pero no pudimos insistir en ella a falta de pruebas experimentales.

La afirmación de Mayer de que las heces de los *Rhodnius prolixus* caen desde el techo sobre los alimentos o sobre los objetos del rancho, tampoco nos parece completamente convincente.

Nosotros tuvimos en cuenta dos hechos principales, que son importantes para la transmisión al perro y al hombre: 1.º, que las heces de *Musca domestica* son prácticamente invisibles, y 2.º, que es un hecho de observación diaria que el perro ingiere las moscas que le rodean, siendo mucho más raro que tenga oportunidad de comer chipos.

Para tratar de probar nuestra hipótesis de trabajo hicimos lo siguiente:

Experiencias realizadas

El material para empezar el trabajo fue un lote de 20 ninfas de *Rhodnius prolixus* sometidas a prolongado ayuno, las cuales se alimentaron el día 3 de abril de 1965 sobre un ratón inoculado con *T. cruzi* y fuertemente positivo en sangre periférica.

Los *Rhodnius prolixus* de este xenodiagnóstico se alimentaron de nuevo sobre el mismo ratón 19 días después, y otra vez se alimentaron sobre el mismo a los 30 días.

El día 31 de mayo, o sea cuando los *Rhodnius prolixus* tenían unos 50 días de incubación desde la primera comida, llevamos a cabo la prueba siguiente:

Se sacrificaron dos *Rhodnius prolixus* del xenodiagnóstico indicado, se encontraron positivos a *Trypanosoma cruzi* en las

heces, y entonces extrajimos totalmente las heces de los dos por compresión abdominal realizada sobre una lámina de Willis. Tomamos después un lote de 10 moscas (*Musca domestica*) que habían sido capturadas unos días antes en el jardín de nuestra casa particular; colocamos las 10 moscas en un vaso y lo invertimos sobre las heces de *Rhodnius prolixus*, comprobando que las moscas tomaban este material con gran avidez. Se mantuvo durante 20 minutos el contacto de las moscas con las heces de los chipos, y al cabo de ese tiempo se separaron las moscas, que 10 minutos después fueron trituradas con ayuda de unas tijeras y mezcladas con leche, haciendo dos lotes de cinco moscas cada uno. Cada lote se dio a beber a un cachorro de perro de dos meses de edad, observando que los perros se bebían la leche y comían sólo una parte de las moscas, lo que atribuimos a estar las moscas poco trituradas. Al día siguiente repetimos la experiencia, o sea que tomamos nuevamente heces de *Rhodnius prolixus* positivas a *Trypanosoma cruzi* y sobre ellas alimentamos 26 moscas durante 45 minutos. Luego trituramos las moscas en leche, y dimos a los mismos perros el alimento contaminado, correspondiente a cada perro 13 moscas. Por tercera vez repetimos la prueba el día siguiente, manteniendo esta vez las moscas 45 minutos en alimentación y dando a cada perro 7 moscas mezcladas en leche.

En resumen, teníamos dos perros de dos meses de edad que durante tres días consecutivos habían ingerido un total de 25 moscas (*Musca domestica*) después de que dichas moscas se habían alimentado sobre heces de *Rhodnius prolixus* positivas a *Trypanosoma cruzi*. Había otros dos perros del mismo lote que no fueron sometidos a la prueba y eran los testigos.

Los perros fueron examinados por medio de punción de la vena marginal de la oreja y estudio en fresco de la sangre, con los siguientes resultados:

Día 16-6-1965 (incubación 16 días). Todos los perros fueron negativos en sangre periférica.

Día 23-6-1965 (incubación 23 días). Todos los perros fueron negativos en sangre periférica.

Día 28-6-1965 (incubación 28 días). Todos los perros fueron negativos en sangre periférica, examinando dos gotas de sangre de cada uno.

En vista de este resultado negativo decidimos practicar la

prueba del chipo, y para ello anestesiábamos a los perros utilizando pentotal sódico diluido a la concentración de 0,1 g. del producto por c. c. de agua bidestilada. El peso de los perros era de 3,5 kg., y aplicando el producto por vía intravenosa se obtuvo la anestesia con una dosis de 0,2 a 0,5 c. c. de la dilución.

Se hizo la prueba del chipo con 5 ninfas de *Rhodnius prolixus* para cada perro, obteniendo los siguientes resultados:

El perro n.º 1, alimentado con moscas, resultó positivo (+) a prueba del chipo, viéndose 1 trypanosoma en la preparación del primer chipo examinado; el segundo chipo examinado era positivo (+), viéndose 7 trypanosomas en la preparación. Los otros 3 chipos no fueron examinados.

El perro n.º 2, alimentado con moscas, resultó positivo (+) a la prueba del chipo, contándose un trypanosoma por cada preparación.

Los dos perros testigos núms. 3 y 4 fueron negativos en la prueba del chipo.

Esta experiencia se resume en el cuadro n.º 7.

CUADRO 7

	1 día	día 2	día 3	día 16	día 23	día 28
Perro 1	5 moscas	13 moscas	7 moscas	— S	— S	— S + Ch
Perro 2	5 moscas	13 moscas	7 moscas	— S	— S	— S + Ch
Perro 3	Testigo	Testigo	Testigo	— S	— S	— S — Ch
Perro 4	Testigo	Testigo	Testigo	— S	— S	— S — Ch

Después de esta experiencia decidimos realizar otra en condiciones más severas, para tratar de estudiar si realmente las moscas albergan los trypanosomas en su aparato digestivo, y si la transmisión puede tener lugar después de algún tiempo.

Para ello, el día 12 de julio de 1965 tomamos un lote de *Musca domestica* (captura en nuestro domicilio) y lo alimentamos so-

bre heces de tres *Rhodnius prolixus* positivas a *Trypanosoma cruzi*. Las moscas estuvieron comiendo durante 45 minutos, pasados los cuales se mataron por inmersión en agua y luego se depositaron en una caja de Petri, donde se pusieron a secar bajo la luz de una lámpara de 60 W. durante 1 hora. Pasado este tiempo, se disecó cada mosca, separando tórax, patas y alas y dejando sólo el abdomen de cada una. Cada perro recibió el abdomen de 10 moscas mezclado con leche y alimentamos tres perros, n.º 25, 76 y 78. Al día siguiente repetimos la prueba en las mismas condiciones, tomando cada perro nuevamente 10 moscas (el abdomen) mezcladas con leche.

En esta prueba teníamos, pues, tres perros de dos meses de edad que durante dos días consecutivos habían ingerido un total de 20 moscas (*Musca domestica*) después de que dichas moscas se habían alimentado sobre heces de *Rhodnius prolixus* positivas a *Trypanosoma cruzi*, y las moscas se habían secado durante una hora bajo una lámpara de 60 W, dando a los perros solamente el abdomen de las moscas.

Los perros fueron examinados en sangre periférica y se sometieron a la prueba del chipo, con los resultados que se expresan en el cuadro n.º 8.

CUADRO 8

	día 1	día 2	día 24	día 25	día 28	día 30	día 35
Perro 25	10 moscas	10 moscas	S — Ch —	— +	— +	— —	— +
Perro 76	10 moscas	10 moscas	S — Ch —	— —	— —	— —	— +
Perro 78	10 moscas	10 moscas	S — Ch —	— —	— —	— —	— —

S = Sangre en fresco

Ch = Prueba del Chipo.—

Conclusiones:

Las experiencias que acabamos de relatar demuestran que los perros pueden contaminarse y adquirir el *Trypanosoma cruzi* por vía bucal en condiciones experimentales cuando ingieren le-

che que contiene moscas (*Musca domestica*) alimentadas sobre heces de *Rhodnius prolixus* positivas al *Trypanosoma*. En la primera experiencia los resultados fueron 100 por 100 positivos, y en la segunda se infectaron dos perros de tres empleados. Esta segunda prueba fue realizada en condiciones más severas, pero de todas maneras pensamos que su menor positividad se debe principalmente a que solamente se les administraron las moscas durante dos días, mientras en la prueba primera se hizo durante tres días. Indudablemente, en condiciones naturales los perros ingieren moscas durante muchos días sucesivos. Otro hecho a destacar es que los perros positivos (núms. 25 y 76) fueron positivos solamente en la prueba del chipo, y aún no han sido positivos en sangre en el momento de redactar este trabajo (36 días después de la prueba), lo que demuestra que la prueba del chipo resulta indispensable para esta clase de estudios, y que indudablemente, tanto en experiencias nuestras como en otros autores, cuando se empleó el examen directo de sangre periférica, se pudo haber dado como negativos animales de experimentación que en realidad hubieran sido positivos de haber usado la prueba del chipo.

Creemos razonable deducir que en el rancho chagásico son las moscas (*Musca domestica*) las que toman el *Trypanosoma cruzi* al alimentarse sobre las heces de los *Rhodnius prolixus* refugiados en el techo y las paredes y luego extienden por los alimentos, especialmente la leche, y objetos diversos sus heces prácticamente invisibles y conteniendo trypanosomas patógenos, o bien las moscas son tragadas por los perros directamente.

V. RESUMEN. UNA NUEVA TEORÍA SOBRE LA TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

En esta última parte de nuestro trabajo vamos a tratar de resumir los nuevos hechos experimentales, y también vamos a tratar de plantear nuestra opinión sobre el mecanismo de transmisión de la enfermedad de Chagas en el rancho, tanto para el hombre como para el perro, gato y otros vertebrados.

En primer lugar, vamos a recordar los hechos principales que aconsejaban revisar los viejos conceptos sobre epidemiología chagásica. Al final, expondremos nuestra teoría sobre transmisión:

1.° El *Rhodnius prolixus* extradomiciliario.

Recordamos una vez más el trabajo de Gamboa (1962), quien demostró que el *Rhodnius prolixus* vive fuera de la vivienda humana, especialmente en las palmeras, y en las mismas se encuentran ya infectados por el *Trypanosoma*, el cual adquieren sin duda de los animales silvestres o de perros, ratas, etc., siendo el hombre mismo, al techar sus ranchos con hojas de palmeras, quien introduce en su vivienda, tanto el trypanosoma como su transmisor. De aquí se deduce que el perro puede adquirir la enfermedad, ya sea en el rancho de sus dueños o en el campo, si duerme al abrigo de las palmeras.

Este trabajo ha sido confirmado por el Dr. J. C. Jiménez (1964), quien en un informe para la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental expone el desarrollo de la campaña contra la enfermedad de Chagas en el Estado Lara, y da cuenta de que en sus exploraciones extradomiciliarias, el 43 por 100 de las exploraciones positivas pertenecían a cardón seco, el 28,5 por 100 a árboles secos, y el 28,5 por 100 a gallineros.

2.° La prueba del chipo.

Nosotros, en este trabajo, hemos llamado «prueba del chipo» a una utilización de las ninfas de *Rhodnius prolixus* para el diagnóstico inmediato de la trypanosomiasis *cruzi* en animales de laboratorio inoculados, y también para utilizar la sangre absorbida por los chipos para hacer nuevas inoculaciones.

Hemos demostrado que la prueba del chipo constituye el método de diagnóstico más seguro para el diagnóstico en los animales de experimentación inoculados con *T. cruzi*, siendo además más precoz que el examen de sangre en fresco y tiene un margen de efectividad de por lo menos 5 horas, sin llegar a 24 horas.

La prueba del chipo sirve también para extraer sangre de animales positivos a *T. cruzi* e inocular nuevos animales sin riesgo de fracasos ni peligro para los donantes.

3.° Contaminación por la vía bucal.

En la primera parte de nuestro trabajo, repitiendo y ampliando los trabajos de Mayer (1961), demostramos que en el perro la vía bucal es muy segura para la contaminación con

T. cruzi, por lo que debe ser el modo natural de contaminación.

En la segunda parte de nuestro trabajo hemos demostrado que cuando el *T. cruzi* entra por la vía bucal es capaz de seguir la vía digestiva, sobrepasando el estómago para llegar al intestino. Del estudio de las lesiones deducimos la probabilidad de que sigan la vía porta y constituyan en el hígado la primera lesión.

4.° Papel de las moscas (*Musca domestica*) en la transmisión.

En otra parte de nuestro trabajo, y siguiendo los estudios anteriores de Vergani (1962), demostramos que la *Musca domestica* alimentada experimentalmente sobre heces de *Rhodnius prolixus* positivas a *T. cruzi* es capaz de adquirir el trypanosoma y transmitírselo a los perros cuando los mismos se alimentan con dichas moscas mezcladas con leche.

Después de esta última experiencia resulta como una conclusión evidente la siguiente teoría :

Una nueva teoría sobre la transmisión de la enfermedad de Chagas en los vertebrados

Podemos considerar que, a partir de los reservorios naturales (cachicamo, etc.) el *Trypanosoma cruzi* alcanza a establecerse en las plantas, principalmente en las palmeras o en los cardones, donde ya se encuentran *Rhodnius prolixus* positivos al trypanosoma. La llegada de los chipos infectados a la vivienda humana puede tener lugar por el mismo hombre cuando corta hojas de palmeras o traslada cardones para construir parte de su vivienda, llamada «rancho», pero incluso a viviendas bien construídas pueden llegar los *Rhodnius prolixus* infectados procedentes de las plantas de alrededor, ya sea volando en la noche o introducidas con leña. De todos modos, es en la pared y el techo del rancho donde preferentemente se encuentran los chipos, que forman grandes colonias y salen de noche para alimentarse sobre los habitantes del rancho, tanto hombres como animales (perros, gatos, roedores, etc.).

Una vez establecidos los *Rhodnius prolixus* en la vivienda humana, se infectan por *Trypanosoma cruzi* al alimentarse so-

bre animales o personas portadores del trypanosoma. Es interesante señalar el papel que pueden desempeñar los perros de caza.

Los chipos infectados mantienen su ciclo biológico alimentándose de noche sobre el hombre y los animales, y durante este proceso es indudable que se pueden establecer infecciones por vía ocular o mucosa, vía cutánea, etc., aunque no nos parece lo más probable, como lo demuestra en Venezuela el porcentaje con que Pifano (1962) encuentra el síndrome oftalmoganglionar (sólo en el 22 por 100) y el chagoma cutáneo (sólo en el 6,66 por 100).

Lo más probable, de acuerdo con nuestras experiencias, y especialmente en el perro, es que la *Musca domestica* al alimentarse en los intersticios de la pared y del techo sobre heces frescas de *Rhodnius prolixus* infectados por *T. cruzi* vaya diseminando por el rancho sus heces, y estas heces de las moscas contienen el *T. cruzi*, que de este modo alcanza diversos alimentos (queso, leche, etc.) o simplemente ensucia objetos del rancho (cubiertos, herramientas, ropas, etc.), y a través de estos vehículos el trypanosoma puede infectar al perro, al hombre y a otros vertebrados por la vía bucal. En el caso del perro el mecanismo estaría favorecido por la frecuencia con que los perros comen las moscas que les molestan con insistencia.

Después que el hombre o los animales han ingerido heces de moscas positivas al *T. cruzi*, o que los perros han ingerido moscas infectadas, los trypanosomas rebasan el estómago, llegan al hígado, donde producen la primera lesión antes de diseminarse por el organismo. La huella es una hepatitis centrolobulillar, que sería un signo específico por haberse observado en todos los animales alimentados con trypanosomas, faltando en los testigos. Desde el foco hepático el trypanosoma se disemina por el cuerpo, localizándose en la musculatura, especialmente en la cardíaca, y por lo que se refiere a las formas hemáticas, parece que ellas se encuentran más abundantes en la red capilar y sistema lacunar, que es de donde los hemos obtenido por medio de la «prueba del chipo».

No cabe duda que en los raros casos en que se establezca la vía ocular para la contaminación (22 por 100 de los casos venezolanos), también puede realizarse más probablemente por las heces de las moscas que por las heces de los chipos.

RESUMEN

El trabajo está dividido en cinco partes.

En la parte primera, el autor destaca la importancia de la enfermedad de Chagas en Venezuela, y señala que en el perro es mucho más frecuente que en el hombre, lo que tiene gran significación en la lucha contra la enfermedad humana.

Se recuerda el ciclo evolutivo y se revisan las vías de entrada del trypanosoma, dando especial importancia a la vía ocular y cutánea, haciéndose una crítica de dichas vías.

Se exponen los antecedentes bibliográficos de la vía de entrada bucal, especialmente las experiencias de Mayer.

Se administran heces de *Rhodnius prolixus* con *Trypanosoma cruzi* mezcladas con leche a lotes de acures, ratas adultas, ratones blancos, cachorros y perros adultos. Se examina en fresco la sangre de los animales y se encuentran positivos el 100 por 100 de los cachorros de perro, el único perro adulto, 4 acures de 5 empleados, 6 ratas de 10 empleadas y fueron negativos (por examen en fresco) todos los ratones.

El acure que fue negativo en sangre periférica resultó positivo por xenodiagnóstico. De las cuatro ratas negativas en sangre periférica, 2 fueron positivas por xenodiagnóstico, siendo negativas las otras dos. Los 7 ratones empleados, que fueron negativos en sangre periférica, resultaron positivos por xenodiagnóstico.

En un cochorro de perro se obtuvo un frotis de sangre, que, después de teñido, permitió observar el *Trypanosoma cruzi*. En el mismo animal se encontró una miocarditis aguda chagásica típica con nidos de leishmanias al mes y medio de la infección bucal. Una rata mostró invasión masiva del corazón por las leishmanias.

Se llega a la conclusión de que en el perro la vía bucal debe ser el modo natural de la contaminación y que, probablemente, en el hombre hay que aceptar la puerta de entrada bucal en todos los casos en que no existe el complejo oftalmoganglionar ni el chagoma cutáneo.

* * *

En la segunda parte se relata haber conseguido la transmisión del *Trypanosoma cruzi* a perros, acures y ratas a los que

se administra por vía bucal leche conteniendo heces de *Rhodnius prolixus* infectados. Se señala la brevedad del paso de los alimentos por el estómago en el perro. Se estudian las lesiones en los animales positivos, encontrando en el intestino eosinofilia de la mucosa, en el hígado hepatitis intersticial, que falta en animales sanos del mismo lote examinados, y en el corazón y células musculares del pulmón se encuentran las leishmanias.

Se toma un lote de cachorros de perro de seis semanas de edad y se les administran cápsulas de gelatina conteniendo heces positivas de *Rhodnius prolixus* suspendidas en suero fisiológico, obteniendo resultado positivo en el 100 por 100 de los casos, y la cantidad de trypanosomas en sangre periférica a los 30 días de la alimentación es muy superior a la obtenida cuando los parásitos se dieron con leche. Se intenta el recuento de trypanosomas con la cámara de Neubauer, obteniendo buenos resultados y dando para los tres perros empleados las cifras de 4, 50 y 16 trypanosomas por mm. cúbicos de sangre, respectivamente. Se critica el recuento por centrifugación. Se plantean las siguientes conclusiones: 1.º El perro es capaz de adquirir la enfermedad de Chagas por ingestión de heces contaminadas de *Rhodnius prolixus*. 2.º Los trypanosomas son capaces de seguir la vía digestiva y atravesar el estómago para llegar al intestino. 3.º Los trypanosomas atraviesan el intestino para caer en la circulación del sistema porta. 4.º Llegados los trypanosomas al hígado, constituyen en él el foco primario, causando lesiones de hepatitis intersticial. 5.º Del hígado, y después de la evolución del foco primario, los trypanosomas caen a la sangre para diseminarse en el organismo y localizarse en la musculatura, especialmente en la cardíaca.

* * *

En la tercera parte se describe la «Prueba del chipo», que consiste en alimentar un *Rhodnius prolixus* sobre animales infectados por trypanosomas y utilizar la sangre recién absorbida por el chipo, ya sea para diagnóstico, ya para inoculación.

En su uso diagnóstico la prueba del chipo se muestra más precoz y más positiva que el examen de sangre en fresco en animales inoculados experimentalmente con *Trypanosoma ve-*

nezuelense y con *Trypanosoma cruzi*. El autor demuestra que la prueba tiene una efectividad de por lo menos cinco horas, usando un solo chipo para cada prueba.

En su uso para inoculaciones, se demuestra su gran utilidad, siendo 100 por 100 positivas las inoculaciones hechas con material extraído del estómago de *Rhodnius prolixus* alimentados sobre animales positivos a *T. venezuelense* y a *T. cruzi*.

* * *

En la parte cuarta se estudia el papel de la *Musca domestica* en la transmisión del *Trypanosoma cruzi*, basando la hipótesis de trabajo en los fundamentales trabajos de Vergani y de Mayer.

El autor alimenta moscas sobre heces de *Rhodnius prolixus* positivos a *Trypanosoma cruzi* y después administra dichas moscas mezcladas con leche a dos cachorros de perros de dos meses de edad. Cada perro tomó 25 moscas (*Musca domestica*) en tres días consecutivos. A los 28 días los perros eran negativos en sangre periférica, pero practicada la prueba del chipo resultó altamente positiva, siendo todas las pruebas negativas en dos perros del mismo lote utilizados como testigos.

Un segundo lote formado por 3 perros de dos meses de edad fue alimentado con leche conteniendo el abdomen de moscas que se habían alimentado sobre heces positivas de *Rhodnius prolixus* y las moscas se habían secado durante una hora bajo una lámpara de 60 W. Cada perro recibió el abdomen de 10 moscas el primer día y el de otras 10 el segundo día. A los 25 días fue positivo en chipo uno de los perros. A los 35 días fue positivo en chipo el segundo de los perros, y el tercer perro sigue en observación.

De estas experiencias el autor deduce que en el rancho chagásico son las moscas (*Musca domestica*) las que toman el *Trypanosoma cruzi* al alimentarse sobre las heces de los *Rhodnius prolixus* refugiados en el techo y las paredes y luego extienden por los alimentos (especialmente la leche) y objetos diversos sus heces prácticamente invisibles y conteniendo trypanosomas patógenos, o bien las moscas son tragadas por los perros directamente.

* * *

Por último, en la quinta parte, el autor resume los trabajos anteriores y expone los nuevos conocimientos que aconsejaban revisar los viejos conceptos sobre epidemiología chagásica.

Recuerda los trabajos de Gamboa y J. C. Jiménez sobre hallazgos del *Rhodnius prolixus* en ambientes extradomiciliarios.

Resume su experiencia sobre la prueba del chipo, la contaminación por vía bucal y el papel de las moscas (*Musca domestica*) en la contaminación.

Como conclusión final, el autor emite una nueva teoría sobre la transmisión de la enfermedad de Chagas en los vertebrados, considerando que, a partir de los reservorios naturales (cachicamos, etc.) el *Trypanosoma cruzi* alcanza a establecerse en las plantas, principalmente en las palmeras y en los cardones, donde ya se encuentran *Rhodnius prolixus* positivos al trypanosoma. La llegada de los chipos infectados a la vivienda humana puede tener lugar por el mismo hombre cuando corta hojas de palmera o traslada cardones para construir partes de su vivienda, llamada «rancho», pero incluso a viviendas bien construidas pueden llegar los *Rhodnius prolixus* infectados procedentes de las plantas de alrededor, ya sea volando en la noche o introducidas con leña. De todos modos, es en la pared y el techo del rancho donde preferentemente se encuentran los chipos, que forman grandes colonias y salen de noche para alimentarse sobre los habitantes del rancho, tanto hombres como animales (perros, gatos, roedores, etc.).

Una vez establecidos los *Rhodnius prolixus* en la vivienda humana, se infectan por *Trypanosoma cruzi* al alimentarse sobre animales o personas portadores del trypanosoma. Es interesante señalar el papel que pueden desempeñar los perros de caza.

Los chipos infectados mantienen su ciclo biológico alimentándose de noche sobre el hombre y los animales, y durante este proceso es indudable que se pueden establecer infecciones por vía ocular o mucosa, vía cutánea, etc., aunque no nos parece lo más probable, como lo demuestra en Venezuela el porcentaje con que Pifano (1962) encuentra el síndrome oftalmoganglionar (sólo en el 22 por 100) y el chagoma cutáneo (sólo en el 6,66 por 100).

Lo más probable, de acuerdo con nuestras experiencias, y especialmente en el perro, es que la *Musca domestica* al alimentarse en los intersticios de la pared y del techo sobre heces frescas de *Rhodnius prolixus* infectados por *T. cruzi* vaya diseminando por el rancho sus heces, y estas heces de las moscas contienen el *T. cruzi*, que de este modo alcanza diversos alimentos (leche, queso, etc.) o simplemente ensucia objetos del rancho (cubiertos, herramientas, ropas, etc.), y a través de estos vehículos el trypanosoma puede infectar al perro, al hombre y a otros vertebrados por la vía bucal. En el caso del perro el mecanismo estaría favorecido por la frecuencia con que los perros comen las moscas que les molestan con insistencia.

Después que el hombre o los animales han ingerido heces de moscas positivas al *T. cruzi* o que los perros han ingerido moscas infectadas, los trypanosomas rebasan el estómago, llegan al intestino, atraviesan su pared y por vía porta llegan al hígado donde producen la primera lesión antes de diseminarse por el organismo. La huella es una hepatitis centrolobulillar, que sería un signo específico por haberse observado en todos los animales alimentados con trypanosomas, faltando en los testigos. Desde el foco hepático el trypanosoma se disemina por el cuerpo localizándose en la musculatura, especialmente en la cardíaca, y por lo que se refiere a las formas hemáticas, parece que ellas se encuentran más abundantes en la red capilar y sistema lacunar, que es donde las hemos obtenido por medio de la «prueba del chipo».

No cabe duda que en los raros casos en que se establezca la vía ocular para la contaminación (22 por 100 de los casos venezolanos), también puede realizarse más probablemente por los heces de las moscas que por las heces de los chipos.

S U M M A R Y

In a series of experiments the author shows that the administration of faeces of *Rhodnius prolixus* infected with *T. cruzi* suspended in milk produce trypanosomiasis, as demonstrated by fresh blood examination or by xenodiagnosis, in «acures», adult rats, white mice, puppies and adult dogs. The puppies were most receptive and showed trypanosomes most frequently by blood examination. The intensity of infestation in

the latter animals was greatest when the faeces were administered in gelatine capsules instead of with milk.

The study of the lesions allows the conclusion to be made that the trypanosomes pass through the intestine wall and, through the blood stream, reach the liver where they cause intersitkial hepatitis. From the hepatic focus they are disseminated to other organic regions, especially muscular and, preferentially, heart muscle.

A study, based on the works of Vergani and Mayer, has been made of the role of *Musca domestica* as a carrier. Flies fed on faeces of *R. prolixus* infected with *T. cruzi* were administered, either whole or only the stomach, to puppies, and after 25 to 28 days the infestation of these animals was checked by xenodiagnosis.

In its diagnostic use, «Chipo's Test» (xenodiagnosis) was shown to give results sooner, and to be more positive, than the fresh blood test with animals experimentally inoculated with *T. venezuelense* and *T. cruzi*.

The author puts forward a new theory about the transmission of Chagas' Disease, considering that, starting from the natural reservoirs («cachichanos», etc.), *T. cruzi* becomes established in plants, above all in palms and teasels, where *R. prolixus* positive to trypanosomes are already to be found. With the palm leaves and those of teasels used in the construction of dwellings («rancho») it would be possible for the carrier insect to reach the latter. In them they would become infested with *T. cruzi* on biting infected people and animals and, in their turn, would transmit the disease on feeding upon healthy people and animals by means of the classic mechanism (ocular, mucus, cutaneous, etc.).

Nevertheless, in view of the infrequency with which ophthalmogangliar syndrome and cutaneous chagoma are shown (22 % and 6,66 % respectively), the author believes that the oral tract plays a main part. Flies, on feeding on fresh faeces of *R. prolixus*, carriers of trypanosomes and on evacuating the parasites with their excrement, disseminate them on objects and food in the dwellings, from whence by means of hands or the food itself, they would be carried to the mouth and digestive tracts, through which they would produce the infestation.

BIBLIOGRAFIA

- BORDET, COULON, J. y SEVESTRE, J. (1962).—Le repas d'épreuve en radiologie. Méthodologie de Analyse radiographique du transit digestif des Carnivores domestiques. — *Rec. Med. Vet.*, CXXXVIII, 4: 249-256.
- DARLING, S. T. (1912).—Experimental infection of the mule with *Trypanosoma hippicum* by means of *Musca domestica*. *J. Exper. Med.*, 15: 4, 365-366.

- DARLING, S. T. (1912).—Notes on transmission of *Tr. hippicum* by means of *Musca domestica*. *Proc. Canal Zone Med. Ass.* (Mount Hope, Oct., 1911-Mar., 1912) 4: 2, 82.
- DARLING, S. T. (1912).—The part played by flies and other insects in the spread of infectious diseases in the tropics with special reference *hippicum* by *Musca domestica* *Tr.* 15. *Internat. Cong. Hyg. and Demog.* (Wash., Sept. 23-28, 1912), 4: 1, 182-185.
- DÍAZ-UNGRÍA, C. (1964).—Transmisión experimental del *Trypanosoma cruzi* en los vertebrados. I. Contaminación bucal a partir de heces de *Rhodnius prolixus* infectados. *Rev. Vet. Venezolana*, XVI, 95: 341-352, Junio de 1964.
- DÍAZ-UNGRÍA, C. (1964).—Transmisión Experimental del *Trypanosoma cruzi* en los vertebrados. II. Camino que sigue el *Trypanosoma* en el organismo de los vertebrados, cuando se les contamina por la vía bucal. *Rev. Vet. Venezolana*, XVII, 96: 3-13.
- DOMÍNGUEZ QUESADA, J. (1964).—Investigaciones sobre la enfermedad de Chagas en el municipio José María Blanco, del Estado Lara. *Boletín informativo de la Dir. de Malariología y Saneamiento Ambiental*, IV, 1: 41-51.
- GAMBOA, C. J. (1963).—Comprobación de *Rhodnius prolixus* extradomiciliado en Venezuela (comunicación preliminar). *Bol. Of. Sanit. Panam.* V, LIV. 1: 18-25.
- GÓMEZ NÚÑEZ, J. C. (1964).—Comunicación personal.
- JIMÉNEZ, J. C. (1964).—Informe sobre la campaña contra la enfermedad de Chagas en el Estado Lara llevada a cabo por el servicio de endemias rurales de la zona VI. Folleto publicado por la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental. División de Endemias Rurales. 14.
- LANGERÓN, M. (1909).—*Precis de microscopie*, Masson, París.
- MAYER, H. F. (1961).—Infección experimental con *Trypanosoma cruzi* por vía digestiva. *An. Inst. Med. Regional*, 5: 3, 43-48, y en *Rev. Fac. C. Vet. de La Plata*, III, 9: 411-415.
- MAYER, H. F. y ALCARAZ, I. (1956).—Investigaciones sobre esquizotripanosis en perros y gatos de la zona suburbana de Resistencia. *An. Inst. Med. Regional*, 4: 1, 9-17.
- PEDREIRA DE FREITAS, J. L. (1961).—Diagnóstico de laboratorio de molestias de Chagas. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, LI, 5: 429-438.
- PIFANO, C. F. (1954).—El diagnóstico parasitológico de la enfermedad de Chagas en fase crónica. Estudio comparativo entre la gota gruesa y el xenodiagnóstico, el hemocultivo y las inoculaciones experimentales en animales sensibles. *Arch. Venez. Pat. Trop. y Paras. Médica*, II, 2: 121-157.

- PIFANO, C. F. (1960).—Algunos aspectos de la enfermedad de Chagas en Venezuela. *Arch. Venez. Med. Trop. y Paras. Médica*. III, 2: 73-101.
- PIFANO, C. F. (1960).—La enfermedad de Chagas y sus problemas. *Arch. Venez. Pat. Trop. y Paras. Médica*. III, 2: 101-107.
- RODRÍGUEZ CABRERA, C. y MERINO, E. (1964).—Protocolos de los estudios anatomopatológicos.
- ROMAÑA, C. (1963).—Enfermedad de Chagas. I volumen.
- TALICE, R. V. (1944).—Enfermedades parasitarias del hombre y parásitos de interés médico. Tomo I. Montevideo.
- THOMSON, J. G.; y LAMBORN, W. A. (1934).—a.-Mechanical transmission of trypanosomiasis, leishmaniasis, and yaws through the agency of non-biting haematophagous flies. Preliminary note on experiments. *Brit. Med. J.* (3.845), Sept. 15, 506-509.
- TORRICO, R. A. (1950).—Conocimientos actuales sobre la enfermedad de Chagas en Bolivia. *Bol. Of. Sanit. Panam.* XXIX; 827-841.
- VERGANI, F. (1952).—Estudio sobre la vección de trypanosomas por medio de dípteros no vulnerantes. *Bol. Inv. Vet.*, IV, 20; 657-672.