

A REFRACTARIEDADE DAS AVES AO "TRYPANOSOMA (SCHIZOTRYPANUM) CRUZI"

II — REFRACTARIEDADE DAS GALINHAS DESDE O NASCIMENTO; PERSISTÊNCIA DA REFRACTARIEDADE APÓS BURSECTOMIA; INFECÇÕES EM OVOS EMBRIONADOS^{1*}

F. NERY-GUIMARÃES * **

e

HELLY A. LAGE * ***

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Guanabara

SUMÁRIO: "A refratariedade das galinhas ao *T. (S.) cruzi*, ocorre desde o nascimento e não é eliminada pela bursectomia hormonal. Noventa e oito pintos de 1 a 15 dias de vida (normais ou tratados com testosterona) inoculados com o *T. (S.) cruzi* foram negativos. Deste modo, dificilmente a refratariedade poderia ser interpretada como decorrência de um "anticorpo natural", uma vez que a bursectomia provoca uma queda na produção de anticorpos e das gamaglobulinas. Em cerca de 50% de ovos embrionados (normais ou tratados com o hormônio) foram vistos flagelados do 4.º ao 12.º dia de inoculação, observando-se ninhos de amastigotos em alguns embriões. Os pintos nascidos dos mesmos grupos dos ovos examinados e positivos, foram sistematicamente negativos pelo exame do sangue. Um deles sacrificado horas depois de nascido, mostrou amastigotos no coração, mas esses parasitos pareciam degenerados. Provavelmente, se alguns chegam a evoluir para tripomastigotos, estes são destruídos à medida que as células hospedeiras se rompem, e assim jamais são encontrados no sangue circulante.

HÁ muito é sabido que as aves são refratárias ao *T. (S.) cruzi*, e isto foi confirmado exhaustivamente no trabalho anterior (Nery-Guimarães, 1972-6), verificando-se que os parasitos são destruídos no ponto da inoculação,

não atingindo a corrente circulatória. Neste trabalho são relatadas as experiências que mostram que a refratariedade ocorre desde o nascimento e persiste após a bursectomia, sendo difícil, portanto, atribuí-la à existên-

1 Recebido para publicação em 27 de dezembro de 1971.

* Pesquisadores em biologia e medicina. Instituto Oswaldo Cruz.

** Chefe de Pesquisas do Conselho Nacional de Pesquisas. Membro do Quadro de Peritos da Organização Mundial de Saúde.

*** Bolsista do Conselho Nacional de Pesquisas.

cia de um anticorpo natural. Nos ovos embrionados foram observadas parasitemias de intensidade variável nas vésperas e até no dia do nascimento, mas os pintos nascidos dos mesmos grupos de ovos têm o sangue sistematicamente negativo.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ovos usados nas experiências eram de galinhas brancas Leghorn, e deles nasceram os pintos utilizados.

Foram empregadas 2 amostras de "*T. (S.) cruzi*": cultivos em meio de agar-sangue (NNN) das amostras Y e maf e tripomastigotos metabólicos de sangue heparinado de camundongos infectados com a amostra Y. Os inóculos foram preparados como referido no trabalho anterior (6), mas os parasitos não foram contados. As inoculações nos ovos (0,1 ml) foram feitas na membrana cório-alantóide; e nos pintos (0,3 ml), sob a pele. A pesquisa da infecção nos ovos foi feita pelo exame direto do sangue, colhido de vários pontos, inclusive do coração, nos embriões mortos ou sacrificados. Em uma experiência foram feitas punções nos embriões através de perfuração da casca (imediatamente parafinada), mas, mesmo assim, os embriões geralmente morriam. A pesquisa de infecção nos pintos foi feita não só pelo exame direto do sangue (3-4 vezes entre o 6.º e o 15.º dia da inoculação) como também, e principalmente, pela inoculação do sangue (da veia da asa ou do pescoço) em grupos de 3-4 camundongos recém-nascidos. Estes, por sua vez, tinham o seu sangue examinado 3-5 vezes, entre o 6.º e o 20.º dia da inoculação. De alguns embriões positivos, foi inoculado o sangue em grupos de camundongos recém-nascidos, para verificar a viabilidade dos parasitos depois de passados no organismo dos embriões. Como a finalidade deste trabalho não era demonstrar a adequação dos ovos embrionados como um meio de cultivo, não foram feitas passagens de ovo a ovo.

Bursectomia — Foi feita pela injeção, nos embriões, de 0,1 ml de suspensão oleosa contendo 2,5 mg de testosterona.* 2 Dez ovos foram injetados com 0,1 ml de óleo, sem hormônio. Os órgãos e membranas cório-alantóides de 10 embriões positivos e os órgãos de 10 pintos recém-nascidos de ovos inoculados foram fixados em formol a 10%, e os cortes (6 μ) foram corados pela hematoxilina-eosina (H-E), e também pelo verde metila-pironina. Nos embriões de ovos tratados com o hormônio e mortos ou sacrificados, foram pesquisados resquícios de bursas, do mesmo modo que nos pintos recém-nascidos.

RESULTADOS

A — REFRAATARIEDADE DE PINTOS RECÉM-NASCIDOS NORMAIS

Foram negativas as inoculações com o *T. cruzi* em 16 grupos de 3-4 pintos, com 4h de nascidos e com dias sucessivos de vida de 1 a 15 (total de 54 pintos). Nas experiências anteriores já tinham sido inoculados pintos de 20 dias, que também foram negativos (Nery-Guimarães, 1972-6).

B — PERSISTÊNCIA DA REFRAATARIEDADE APÓS BURSECTOMIA

Pintos bursectomizados — Os pintos nascidos de ovos tratados com o hormônio apresentam edema da cabeça, pescoço e patas, o qual se absorve entre o 4.º e o 6.º dia; eles têm a crista bem desenvolvida e esboço de esporão. Mostram-se muito ativos. Com o avançar dos dias, verifica-se que eles têm deficiência de crescimento. Aos 25-30 dias, embora com grande desenvolvimento da plumagem (principalmente asas e cauda), eles têm pequeno porte. Por exemplo, com 33 dias, 4 pintos

* Durateston "250" - (R) Laboratório Organon do Brasil.

QUADRO I

REFRATARIEDADE AO "*T. (S.) CRUZI*" (AMOSTRAS Y E MAF) DE PINTOS (DE 4 h DE NASCIDOS E DE 1 A 15 DIAS DE IDADE), NORMAIS (N) E TRATADOS COM 2,5 MG DE TESTOSTERONA (T)

Números de pintos inoculados	Inóculo (0,3 ml)			Resultados	
	Cultivos maf	Cultivos Y	Tripomastigotos Y	Exame direto do sangue	Inoculações do sangue em camundongos
N — 54	9	17	25	Negativos	Negativos (180+)
T — 44	3	21	20	Negativos	Negativos (156+)
Totais — 98	12	38	45	Negativos	Negativos (336+)

+ N.os de camundongos inoculados.

QUADRO II

INFECCÕES EM OVOS NORMAIS (N) E TRATADOS COM 2,5 MG DE TESTOSTERONA (T) INOCULADOS COM "*T. S. CRUZI*" (AMOSTRAS Y E MAF)

Números de ovos inoculados	Inóculo (0,1 ml)			Resultados	
	Cultivos maf	Cultivos Y	Tripomastigotos Y	Exame do sangue Neg. Pos.	Inoculações do sangue em camundongos
N — 104	26	58	20	39 30 (43,5%)	Negativos (35/106)+
T — 44	9	20	20	16 23 (59,0%)	Negativos (10/46)+
Totais — 153	35	78	40	55 53 (49,1%)	Negativos (45/152)+

Pos. = positivo. Neg. = negativo.

+ N.º de pintos nascidos/N.º de camundongos inoculados.

pesaram, em média, 190 g. Pintos normais com essa idade, pesam praticamente o dobro.

Nos grupos de embriões tratados com o hormônio aos 6 dias de incubação a mortalidade é elevada; porém, nos tratados aos 12 dias, o número de nascidos é comparável ao de ovos normais. Nestes embriões, quando mortos nas vésperas do provável dia do nascimento (21 dias) e nos pintos deles nascidos e mortos ou sacrificados, não foi encontrado resquício de bursa. Nos embriões normais de 18-20 dias, a bursa já é bem desenvolvida, embora, histologicamente ainda não ocorra uma perfeita definição de medular e cortical nos folículos. Nos pintos nascidos de embriões normais, a histologia da bursa é completa. Nos pintos bursectomizados, nos cortes de baço, são raros os folículos linfóides. A coloração pelo Brachet mostra pobreza de células pironinófilas nos centros germinativos. Dos ovos que receberam apenas 0,1 ml de óleo (sem hormônio) nasceram 9 pintos normais e todos tinham bursa).

Os pintos bursectomizados são muito suscetíveis a infecções e, em geral, morrem precocemente.

Inoculação do *T. (S.) cruzi* em pintos bursectomizados

a) De 34 ovos de 12 dias de incubação tratados com o hormônio, 14 embriões morreram nas vésperas ou no dia provável do nascimento (21 dias). Dos 20 pintos nascidos, 9 morreram ou foram sacrificados. Dos 11 restantes, 6 foram inoculados com 1-2 dias de vida e 5, com 5-6 dias de vida; destes últimos, 2 foram reinoculados 5 dias depois. A pesquisa da infecção foi negativa em todos esses 11 pintos.

b) De 49 ovos que receberam o hormônio aos 6 dias de incubação, nasceram 24 pintos, dos quais, 2 foram sacrificados e 1 morreu. Foram inoculados os 21 pintos restantes: 12 com 3-4 dias de vida; 3 com 7 dias; 3 com 10 dias e 3 com 15 dias. Em todos esses 21 pintos a pesquisa da infecção foi negativa.

c) De 30 ovos que receberam o hormônio aos 12 dias, nasceram 16 pintos e 1 foi sacrificado e 3 morreram. Os 12 restantes foram inoculados com 8-9 dias de vida; e em todos eles, a pesquisa da infecção foi negativa.

C — INFECÇÕES EM OVOS EMBRIONADOS

1 — Inoculações do *T. (S.) cruzi* em ovos normais

a) Foram inoculados 10 grupos de 6-8 ovos com 6 a 15 dias sucessivos de incubação (total de 78 ovos). Cinco a 8 dias depois da inoculação, observou-se a morte dos embriões na maioria dos ovos, principalmente entre os mais jovens. Em 1 a 4 ovos de cada grupo, o exame de sangue dos embriões foi positivo (total de 19). Também foram positivos 6 embriões vivos, examinados aos 6-8 dias depois da inoculação (e com 14 a 18 dias de incubação). Nasceram 19 pintos e em todos eles a pesquisa da infecção foi negativa.

b) Foram inoculados 26 ovos com 16, 17 e 18 dias de incubação. Nos 3 dias seguintes morreram 8 embriões e 3 deles foram positivos. De 6 embriões vivos examinados no 4.º dia, 2 foram positivos. Nasceram 12 pintos e em todos a pesquisa da infecção foi negativa.

2 — Inoculação do *T. (S.) cruzi* em ovos tratados com testosterona

a) Vinte ovos de 6 dias de incubação foram tratados com hormônio, e inoculados no dia seguinte. Morreram 10 embriões do 4.^o ao 10.^o dia da inoculação, e 5 deles foram positivos. Também foram positivos dois embriões sacrificados aos 18 dias de incubação. Nos 8 pintos nascidos, a pesquisa da infecção foi negativa.

b) De 28 ovos tratados com o hormônio aos 6 dias de incubação, morreram 19 nos 4 dias seguintes. Os 9 restantes, aos 11 dias de incubação foram inoculados. Do 4.^o ao 6.^o dia da inoculação morreram 4 e 2 deles foram positivos. Também foram positivos 3 embriões examinados aos 18 dias de incubação. Nasceram 2 pintos e neles a pesquisa da infecção foi negativa.

c) Vinte ovos de 11 dias foram tratados com o hormônio e, concomitantemente, inoculados com *T. (S.) cruzi*. Entre o 4.^o e o 6.^o dia da inoculação morreram 8 embriões e 4 foram positivos. Aos 18 dias de incubação foram examinados 4 embriões vivos e todos foram positivos. Ainda aos 18 dias de incubação foram puncionados 2 embriões (através de perfuração da casca, imediatamente parafinada) e ambos foram positivos. Ambos morreram no dia seguinte e um deles ainda se mostrou positivo (19 dias). Ainda nesse dia, 2 novos embriões foram puncionados e ambos foram negativos. Entretanto, examinados novamente no dia seguinte (20 dias), um deles foi positivo. Aos 21 dias, restavam 3 ovos, um deles examinado na véspera e positivo. Pronto para nascer, esse pinto morreu. Os 2 últimos ovos fo-

ram puncionados, mostrando-se um deles positivo (21 dias). Nesse mesmo dia, esse pinto nasceu, sendo nele negativa a pesquisa da infecção; o outro morreu na casca.

Com apenas 3 exceções (representadas por 2 ovos inoculados com cultivos e 1 com tripomastigotos da amostra Y), os flagelados vistos nos embriões eram exclusivamente epimastigotos. Em apenas 3 embriões a parasitemia era elevada (6 a 10 por campo). De 10 embriões positivos, o sangue retirado diretamente do coração, só foi positivo 2 vezes. A impressão dominante era que na maioria dos ovos os parasitos encontrados eram remanescentes do inóculo, e quando havia infecção, esta ocorria geralmente na membrana cório-alantóide, com repercussão na rede vascular vizinha, raramente tendo sido invadido o embrião propriamente dito. A coloração pelo Giemsa, confirmou que os flagelados eram geralmente epimastigotos, e sua multiplicação ocorria fora das células, assim como nos meios artificiais de cultivo.

No estudo histológico de 10 embriões positivos, foram vistas colônias de amastigotos tissulares em 2 deles, principalmente no coração e fígado. E nos cortes de 10 pintos negativos (nascidos de ovos inoculados) foram vistas colônias de amastigotos no coração de um deles, horas depois de nascido. Esses parasitos davam a impressão de estarem degenerados. Em 1 membrana cório-alantóide, também foram vistos ninhos de amastigotos; mas, todas as outras examinadas, eram de aspecto normal.

De 5 embriões positivos (de grupos diferentes) foi feita inoculação

do sangue em 5 grupos de camundongos recém-nascidos e em 3 deles as inoculações foram positivas, quase sempre em todos os roedores inoculados, demonstrando que os parasitos eram viáveis depois de passados no organismo dos embriões.

Discussão

Foi demonstrado que a refratariedade das galinhas ao *T. (S.) cruzi*, existe desde o nascimento. Com efeito, a inoculação de 54 pintos recém-nascidos foi negativa, inclusive pela inoculação do sangue desses pintos em camundongos recém-nascidos. No trabalho anterior (Nery-Guimarães, 1972) este método diagnóstico foi mais eficiente que o xenodiagnóstico e as tentativas de cultivo em meios de agar-sangue.

A refratariedade das galinhas ao *T. (S.) cruzi*, não foi abolida pela bursectomia hormonal "in ovo": injeção nos embriões de 2,5 mg de testosterona. Esta técnica foi empregada pela suspeita da existência de um anticorpo natural. Antes do emprego da bursectomia, várias experiências de inoculação de ovos e pintos recém-nascidos foram feitas paralelamente e os resultados positivos em vários ovos e sistematicamente negativos nos pintos, aparentemente pareciam apoiar a idéia da presença de um anticorpo natural nos pintos, uma vez que nos embriões não existiriam anticorpos. (Goedbloed & Southgate, 1969) (4). E, por outro lado, Terry (1957) (8) demonstrava que a refratariedade do "cotton-rat" ao *Trypanosoma vivax* era devida à existência de um anticorpo natural. E Warren &

Borsos (1959) (10) concluem pela existência, no soro das galinhas, de dois fatores contra as critídias do *T. (S.) cruzi*: um termo-estável, que seria um anticorpo aglutinante e sensibilizante e um termo-lábil, que seria o complemento.

Como se sabe, a bursectomia interfere com o sistema imunitário bursa-dependente das aves, determinando, inclusive, a queda da produção de anticorpos e gama-globulinas (3, 5 e 9). Entretanto, 44 pintos recém-nascidos de embriões bursectomizados, foram negativos à inoculação com o *T. (S.) cruzi*. Estes resultados não apoiam a hipótese da existência de um anticorpo natural.

Nos ovos embrionados, normais ou tratados com o hormônio e inoculados com o *T. (S.) cruzi*, foram encontrados flagelados em 43,5% e 59,0% respectivamente (do 4.º ao 12.º dia de inoculação). Observou-se maior positividade nos embriões tratados com o hormônio.

De um total de 104 ovos normais, 69 foram examinados e foram encontrados flagelados em 30 embriões (8 vivos e 22 mortos). Trinta e cinco pintos nascidos dos mesmos grupos de ovos inoculados, foram negativos. De um total de 49 ovos embrionados tratados com o hormônio e inoculados com o *T. (S.) cruzi*, foram examinados 39 ovos e foram encontrados flagelados em 11 embriões mortos e em 12 vivos (do 3.º ao 10.º dia da inoculação). Nasceram apenas 10 pintos e neles a pesquisa da infecção foi negativa.

Em alguns ovos inoculados e positivos (aos 3-4 dias da inoculação) o encontro dos parasitos foi interpre-

tado como traduzindo apenas a permanência de formas vivas do inóculo. Pensou-se também que a infecção seria, em geral, da membrana cório-alantóide com repercussão nos vasos vizinhos, que se mostram dilatados, conforme já observara **Ganapati** (1948) (2). Os flagelados encontrados eram geralmente epimastigotos. Os tripomastigotos eram raros. Mas, em dois embriões de 10 examinados histologicamente, a infecção foi indiscutível, com invasão tissular (principalmente no coração e fígado) com a formação de colônias de amastigotos. Em um pinto horas depois de nascido, também foram encontrados amastigotos no coração, mas esses parasitos pareciam degenerados. De qualquer modo, não foram vistos nos pseudocistos nem epimastigotos e nem tripomastigotos, e estes também não foram vistos na única membrana que se mostrou parasitada.

Mesmo dos dois embriões com invasão indiscutível dos parasitos, o sangue retirado diretamente do coração só foi positivo em um deles. Por outro lado, no único pinto de horas de vida com amastigotos no miocárdio, não foi constatada parasitemia. Portanto, a presença dos parasitos no sangue dos embriões, parecia resultar, sobretudo, de multiplicação extracelular, o que é corroborado pelo encontro freqüente de epimastigotos em divisão binária.

Todos os pintos nascidos de ovos inoculados, foram negativos. No entanto, eles provinham dos mesmos grupos de ovos que tinham mostrado flagelados no sangue em cerca de 50% (inclusive 6 ovos com 18 dias de incubação, 2 com 19 dias, 2 com 20

dias e 1 com 21 dias, horas antes de nascido). Infelizmente, mesmo usando do recurso da punção assética, os embriões quase sempre morriam. Só foi conseguido o nascimento de um pinto demonstrado positivo como embrião. Porém, é muito provável que tenha havido infecção em vários embriões daqueles não examinados, (para assegurar o nascimento, e que foram negativos depois de nascidos).

Algo deve ocorrer no lumiar do nascimento que torna o organismo das aves, desfavorável à permanência dos parasitos. Eles desaparecem do sangue, onde podem ser vistos até 12 dias da inoculação. E aqueles que conseguiram atingir a intimidade dos órgãos, transformam-se em amastigotos e se multiplicam, mas aparentemente, são destruídos antes da completa evolução para tripomastigotos. Se, excepcionalmente, alguns destes chegam a ser formados, são provavelmente destruídos à medida que as células hospedeiras se rompem; e esta seria a razão por que não são encontrados no sangue circulante.

As tentativas de cultivo do *T. (S.) cruzi* em ovos embrionados (1939-1960), apresentam desde resultados negativos até o êxito mais ou menos completo. (Bibliografia em **Pipkin**, 1969) (7). **Conejos** (1948) (1) foi o que teve maior sucesso. Inoculou embriões de 10 dias com culturas, e 4 dias depois encontrou ninhos de amastigotos nos órgãos. Com a inoculação de embriões de 5-6 dias, obteve flagelados no sangue, a partir dos 10 dias da inoculação. Nos pintos recém-nascidos, o exame direto do sangue foi negativo (intensivo exame a fresco e em gota grossa) mas, um xenodiag-

nóstico de um pinto de 1 dia foi positivo. O exame histológico de pintos sacrificados em dias sucessivos mostrou colônias de amastigotos em vários órgãos, até o 7.^o dia.

Em 1960, Pipkin (7) retomou o assunto e conseguiu invasão tissular em um pequeno número de embriões, mas não obteve evidentes infecções sanguíneas. Judiciosamente desaconselha a inoculação do *T. (S.) cruzi* em ovos embrionados como um meio adequado de cultivo.

Os nossos resultados estão em desacordo parcial com os de Conejos (1948) (1). Com efeito, ele não encontrou parasitemia nos pintos recém-nascidos, mas observou amastigotos tissulares em pintos de até 7 dias de idade. Como é referida a presença de "leishmanias, critídias e tripanosomas", ao contrário de nós, esse autor teria observado completa evolução nos ninhos de multiplicação. Por outro lado, Conejos (1948) (1) diz ter conseguido infecção em um pinto recém-nascido (ninhos de amastigotos no baço) de um grupo inoculado. Como vimos, nas nossas experiências, desde horas de nascidos, os pintos já são refratários.

Conclusões

Foi verificado que a refratariedade das galinhas ao *T. (S.) cruzi* ocorre desde o nascimento: a inoculação de 54 pintos recém-nascidos, foi negativa. Verificou-se também que a refratariedade persiste após a bursectomia hormonal (injeção nos ovos embrionados de 2,5 mg de testosterona): a inoculação de 44 pintos bursectomizados, também foi negativa. Portanto, dificilmente a refratarieda-

de poderia ser interpretada como resultado da presença de um "anticorpo natural", considerando que a bursectomia determina uma queda na produção de anticorpos e gamaglobulinas.

Em 153 ovos embrionados (normais ou tratados com testosterona) e inoculados com o *T. (S.) cruzi*, foi observada parasitemia do 4.^o ao 12.^o dia da inoculação em cerca de 50% deles. Entretanto, os pintos nascidos dos mesmos grupos de ovos, foram sistematicamente negativos. Como foram encontrados embriões positivos na véspera e até no dia do nascimento, é muito provável que entre aqueles não examinados, e que deram nascimento aos pintos negativos, também existissem alguns positivos. Como nenhum pinto recém-nascido apresentou parasitemia, algo deve acontecer no limiar do nascimento, que torna o organismo das aves, desfavorável à permanência dos parasitos.

A impressão dominante era que em vários embriões positivos, os parasitos eram remanescentes do inóculo. Pensou-se também, que a infecção ocorria principalmente na membrana cório-alantóide com repercussão na rede vascular vizinha, uma vez que o sangue retirado diretamente do coração, raramente foi positivo. Porém, histologicamente, apenas uma membrana mostrou-se parasitada, com raros pseudocistos de amastigotos. Também foram raros os embriões invadidos, com multiplicação dos parasitos nos órgãos internos, principalmente coração e fígado. Esses amastigotos tissulares podem permanecer por algum tempo nos pintos recém-nasci-

dos, mas, aparentemente, degeneram. Se, excepcionalmente, eles chegam a evoluir para tripomastigotos, estes são provablement destruídos assim que as células hospedeiras se rompem; e esta seria a razão por que os flagelados não aparecem no sangue circulante. Uma vez que é rara a presença de amastigotos, quer na membrana cório-alantóide, quer nos órgãos embrionários, a maioria dos parasitos vistos no sangue dos embriões (e que não eram remanescents do inóculo) eram resultantes de multiplication extracelular. Foram vistos epimastigotos em division binária.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

L'état réfractaire des oiseaux au *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* II — Résistance des poulets juste après la naissance et persistance de l'état réfractaire après la bursectomie. Infections dans les oeufs embryonnés.

On a été vérifié que la résistance des poulets au *T. (S.) cruzi* existe juste après la naissance: l'inoculation de 54 poulets fut négative. On a été vérifié aussi que la résistance persiste après la bursectomie hormonelle (injection dans les oeufs embryonnés de 2,5 mg de testosterone): l'inoculation de 44 poulets bursectomisés fut aussi négative. Pourtant, c'est très difficile d'expliquer la résistance comme le résultat de la présence d'un "anticorps naturelle", on a considéré que la bursectomie provoque une chute dans la production d'anticorps.

En 153 oeufs embryonnés (normales ou traités avec testosterone) inoculés avec le *T. (S.) cruzi* furent

observées des infections de variable intensité en environ 50% des embryons. Cependant, les poulets qui ont été nés de les mêmes groupes d'oeufs furent négatives. Comme on a été observé embryons positives jusqu'aux 21 jours d'incubation, c'est beaucoup probable que quelques unes de celui-la non examinés et qui donnent naissance a ces poulets on été positives. Et comme ces poulets ne présentent pas de parasithemie, c'est probable que dans le seuil de la naissance quelque chose arrive qui fait l'organisme des oiseaux défavorable à l'existence des parasites.

L'impression dominant fut qui dans le majeur numéro des embryons positives les parasites proviennent de l'inoculum et aussi d'infections dans la membrane chorion-allantoide avec répercussion dans le réseau vasculaire circundant. Mais, une membrane seulement fut rencontrée infectée par amastigotes tissulaires.

Il n'y a pas aucune doute que plusieurs embryons ont été infectés avec multiplication des parasites dans les tissus. Cependant, les amastigotes résultants peuvent persister par quelque temps dans les poulets nouvelles-nés mais, apparemment, ils dégèrent et, exceptionnellement, complètent l'évolution par trypomastigotes. Et quand celle-ci est accomplis les flagellés sont détruits lorsque les cellules parasitées se rompent, raison pour laquelle les flagellés ne sont pas rencontrés dans le sang circulant. La parasithemie des embryons c'est résultant principalement d'une multiplication extracellulaire. Figures de epimastigotes en division binaire sont beaucoup fréquent.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

The refractory state of birds toward the *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. II — The refractory state begins at hatching and persists after bursectomy. Infections of embryonnated eggs.

It has already been shown that the refractory state of chickens toward "*T. (S.) cruzi*" appears early at time of hatch. Fifty-four normal newly hatched and inoculated chicks were negative. It has also been verified that this refractory state persists even after hormonal bursectomy (eggs being injected with 2.5 mg of testosterone). Forty-four bursectomized and inoculated newly hatched chicks were negative. If we consider the fact that bursectomy causes a deficiency in the production of antibodies and gammaglobulins, the refractory state seems not to occur on account of a "natural antibody".

Inoculations of "*T. (S.) cruzi*" made in 153 eggs (normal or treated with testosterone) produced infections of variable intensity in about 50% of them. Although chicks newly hatched from the same groups were always negative.

As we have some embryos to be positive until the 21st day of incubat-

ion it seems probable that some of those not previously examined and from which these chicks were hatched might have been positive too. Nevertheless, all of them have not parasitemia. So, something happens near the time of hatch that turns the organisms of birds an unfavorable environment to the parasites.

The most impressive idea is that in several of the positive embryos the parasites found were remainders of the inoculum and resulting of the infection of the chorioallantoic membrane and its surrounding blood vessels.

However there is no doubt that in some embryos invasion of tissues by the parasites definitely occurred with amastigote multiplication forms specially in the heart and liver. These amastigotes could persist for some time after hatching but it seems that they degenerated and only exceptionally could accomplish its evolution to trypomastigote forms. And even when this happened the flagellates were destroyed as soon as the host cells burst. Probably that is the reason why they were not met in the peripheral blood. Parasitemia of the embryos results mainly of extracellular multiplication. Epimastigotes in binary division are very frequent.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 — CONEJOS, H., 1948, Cultivo de *T. S. cruzi* en embrion de pollo. *Anales Inst. Med. Reg.*, Tucuman, Argent., 2: 175.
- 2 — GANAPATI, P. N., 1948, Cultivation of *Trypanosoma cruzi* in the Developing Chick Embryo. *Nature*, 162, 4129: 963.
- 3 — GLICK, B., CHANG, T. S. & JAAP, R. G., 1956, The Bursa of Fabricius and Antibody Production. *Poult. Sci.*, 35: 224.
- 4 — GOEDBLOED, E. & SOUTHGATE, B. A., 1969, *Trypanosoma rhodesiense* and *T. brucei*: Absence of Antibodies in Chick Embryos. *Experim. Parasit.* 26: 282.
- 5 — LERNER, K. G., GLICK, B. & McDUFFIE, F. C., 1971, Role of the

- Bursa of Fabricius in IgG and IgM Production in the Chicken: Evidence for the Role of a Non-Bursal Site in the Development of Humoral Immunity. "J. Immunol.", 107: 493.
- 6 — NERY-GUIMARÃES, F., 1972, A refratariedade das aves ao *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. I. Ausência de passagem dos parasitos para o sangue; duração da viabilidade e destruição dos parasitos na pele. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* (Ver este mesmo fascículo).
- 7 — PIPKIN, A. C., 1960, Avian Embryos and Tissue Culture in the Study of Parasitic Protozoa. II. Protozoa Other than *Plasmodium*. *Exper. Parasit.*, 9: 167.
- 8 — TERRY, J., 1957, Antibody Against *Trypanosoma vivax* Present in Normal Cotton Rat Serum. *Exper. Parasit.*, 6: 404.
- 9 — WARNER, N. L., UHR, J. W., THORBECKE, G. J. & OVARY, Z. J., 1969, Immunoglobulins, Antibodies and the Bursa of Fabricius: Induction of Agammaglobulinemia and the Loss of All Antibody-Forming Capacity by Hormonal Bursectomy. "J. Immunol.", 103: 1317.
- 10 — WARREN, LIONEL, G. & BORSOS, TIBOR, 1959, Studies on Immune Factors Occurring in Sera of Chickens Against the Crithidia Stage of *Trypanosoma cruzi*. "J. Immunol.", 82: 585.