

REVISTA DE LA FACULTAD DE MEDICINA

VOLUMEN 31

ABRIL - JUNIO DE 1963

2

NUEVOS ASPECTOS DEL METODO DE XENODIAGNOSTICO CON RHODNIUS PROLIXUS

Por

ERNESTO OSORNO MESA,

HERNANDO OSORNO MESA * (†)

Y

HORST SCHIMMER **

El procedimiento de diagnóstico etiológico para Trypanosomiasis, especialmente para *S. cruzi*, descrito por Brumpt (1) en 1914, llamado *Xenodiagnóstico*, al constituir un método biológico que comprende un eslabón en la cadena del mecanismo de transmisión de la enfermedad de Chagas, es una técnica de la cual no se puede prescindir en el estudio de la dolencia chagásica (2).

No es raro observar que en investigaciones sobre Trypanosomiasis americana haya casos en los cuales los cul-

tivos son negativos con Xenodiagnóstico positivo y, por regla general, no hay Xenodiagnóstico negativo con hemocultivo positivo, como también son numerosos los casos de extensión y gota gruesa de sangre negativos y Xenodiagnóstico positivo (5).

Al observar la irregularidad en los trabajos de muchos investigadores respecto al número de ejemplares ingeridos en el paciente o animal sospechoso y en relación con el número de positivos y negativos, orientamos el presente estudio, de acuerdo con observaciones personales, sobre la diferencia en el hallazgo de formas críticas y metacíclicas (4) en las deyecciones espontáneas de las diferentes etapas que sufre la sangre durante el proceso digestivo de Triatominae, *Rhodnius prolixus* infectados experimentalmente.

* Profesores de Parasitología de la Universidad Nacional, Facultad de Medicina.

** Ex Instructor de Biología, Universidad Nacional, Facultad de Medicina.

SELECCION DE LOS EJEMPLARES

En el curso de este trabajo utilizamos *Rhodnius prolixus* normales e infectados con *S. cruzi* de un caso humano de Chagas procedente de la granja tabacalera de Pinchote (Santander), material traído por el doctor José T. Arria en curies, macho y hembra, inoculados por él desde hacia tres meses.

Los ejemplares de *Rhodnius prolixus* más apropiados para el Xenodiagnóstico, como también para investigaciones de esta índole, son las ninfas de cuarto y quinto estadio; en primer lugar, por la cantidad de sangre ingurgitada en relación con la distensión de los tegumentos y porque tanto de las primeras como de las últimas es muy fácil obtener deyecciones espontáneas en cantidad suficiente para comprobar la positividad o la negatividad. Las de cuarto estadio son las más adecuadas en grandes encuestas de Chagas, porque dan siempre tiempo suficiente para su observación, al suministrar deyecciones con la primera comida infectante, aun después de la muda. La diferenciación del cuarto y quinto estadios se hace al observar con una lupa los muñones de las alas: en el cuarto se aprecia la superposición de los dos pares de alas vestigiales, y en el quinto los hemielitros cubren totalmente el par posterior.

Para hacer picar los *Rhodnius* empleamos tarugos de guadua (0.05×0.05 m.), con tela negra en una de las extremidades, fijada con esparadrapo, y en la otra, tela de punto de gasa sujeta con banda de caucho; en el centro se coloca un rectángulo de esparadrapo para anotar los datos correspondientes (fig. 1). Los tarugos de estas dimensiones dan capacidad para colocar 10 ejemplares de *Rhodnius*, que con ayuno previo de quince días deben permanecer sobre el paciente o animal sospechoso durante treinta mi-

nutos. Una vez retirados los tarugos de la piel, se destapan y se colocan los ejemplares de cada uno, en un balde esmaltado o en un recipiente grande de vidrio para separar los ingurgitados de los vacíos. En estos recipientes las ninfas de cuarto y de quinto estadio nunca ascienden por las superficies pulidas; en cambio los adultos suben sin ninguna dificultad (3). Este fenómeno es debido a la ausencia, en las ninfas, de la foseta tibial esponjosa y a la presencia en los adultos de estos órganos que Gillet y Wingglesworth (1932) describen como "órganos trepadores", localizados en la parte interna de los ápices del primero y del segundo par de patas. Cada foseta tibial esponjosa tiene aproximadamente cinco mil pelos tubulares con glándulas unicelulares que segregan un líquido aceitoso. La ausencia de estos "órganos trepadores" en las ninfas facilita el trabajo de rutina en el manipuleo de *Rhodnius* infectados.

Los ejemplares vacíos se sacrifican y los ingurgitados se colocan aisladamente en dedales de vidrio (0.04×0.02 m.) en los cuales se introduce un pequeño rectángulo de papel de toalla ligeramente plegado, tapados con tela de punto de gasa sujeta con banda de caucho.

Los dedales correspondientes a cada Xenodiagnóstico se disponen en cajas grandes de Petri y se colocan en sitio con temperatura de 25 grados centígrados y grado higrométrico de 70%. La separación individual de los ejemplares con comida infectante sospechosa, especialmente de las ninfas de quinto estadio, tiene grandes ventajas en relación con los cuidados dispendiosos que es necesario tener por vía de precaución con las larvas nacidas, en contacto de las deyecciones, de adultos infectados en el caso de dejarlos reunidos en el tarugo.

De acuerdo con el mecanismo fisiológico de las mudas en que influye

comida de sangre completa y acción hormonal y en relación con las grandes ventajas que tienen las ninfas de quinto estadio, hemos empleado, con pleno éxito, para detener los ejemplares en dicho estadio, darles comida de sangre parcial (8).

DEYECTOGRAMA

Para la observación precisa de la serie de deyecciones, ideamos un aparato que sencillamente consiste en la adaptación de un termógrafo (fig. 2) en el cual se registra el deyectograma, cuyo análisis, si se relacionara con factores químicos y cambios biológicos, daría datos valiosos referentes a la presencia, ausencia e inmovilidad de las formas evolutivas de *S. cruzi* en las deyecciones de *Rhodnius prolixus* infectados. Antes de pasar al deyectógrafo, los ejemplares que tuvieron comida infectante en curi, con abundantes formas circulantes de *S. cruzi*, controlamos la positividad recogiendo directamente las primeras deyecciones hialinas en los insectos pegados con cemento Duco a la parte dorsal del abdomen en la extremidad ensanchada de un mondadientes colocado en el dispositivo de fijación (fig. 3).

Con el método de adhesión al mondadientes, para registrar el deyectograma, los insectos quedan en condiciones tan apropiadas, que no se perturba el fenómeno de la muda, como lo demuestran los ejemplares de control que usamos, colocados libres en dedos con papel de toalla plegado. El adulto, después de la muda, queda encerrado en la caja del termógrafo.

COLORIDO

En el registro del deyectograma (figs. 4 y 5) podemos observar el colorido de la serie de deyecciones en ninfas de quinto estadio, que son las

que hemos usado para tal fin, con comida de sangre hasta la repleción indicada por la turgescencia del tegumento; en estas condiciones la primera y aun la segunda son hialinas, con sedimento negro más o menos abundante, producido por el arrastre del contenido del intestino posterior por la secreción acuosa de los tubos de Malpighi; las siguientes, las más abundantes, continúan hialinas, seguidas de blancas, amarillas claras, oscuras y por último negras.

FRECUENCIA

Respecto a la frecuencia, las de ritmo más acelerado y que se suceden durante más largo tiempo son las hialinas (16 horas). El volumen y la frecuencia de estas deyecciones depende de la cantidad de sangre ingurgitada.

DEYECCIONES Y FORMAS EVOLUTIVAS DE *S. CRUZI*

En ninfas de quinto estadio procedentes de ninfas infectadas de cuarto, hemos encontrado, en deyecciones hialinas, formas inmóviles de critidias y formas metacíclicas móviles. En ejemplares en los cuales la comida de sangre no llega al estado de repleción del insecto, es frecuente encontrar gran número de critidias inmóviles después de transcurrir unos treinta minutos entre la terminación de la comida y la primera deyección.

En deyecciones hialinas hubo supervivencia de formas metacíclicas muy móviles, durante treinta horas, a pesar de dejar la preparación ese tiempo a la temperatura ambiente del laboratorio (15 grados centígrados), muestra cubierta con laminilla y sellada con vaselina (6).

En dos lotes de *Rhodnius prolixus*, cada uno de diez ejemplares, empleados en Xenodiagnóstico de dos curies

positivos para *S. cruzi* examinados a los diez días después de la comida infectante, no encontramos formas metacíclicas sino en dos ejemplares que dieron deyección negra; el resto fue negativo, con deyección blanca. Estos ejemplares se controlaron posteriormente cinco días después con resultado positivo en deyecciones negras.

Si se analiza que la expulsión de formas metacíclicas sufre grandes intermitencias en *Rhodnius prolixus* infectados, se concluye que en encuestas chagásicas en relación con Xenodiagnóstico, pueden resultar falsos negativos en deyección espontánea, en cuyo caso es necesario hacer disección total del tubo digestivo de tales ejemplares (7).

RESUMEN

Se anota la eficiencia del Xenodiagnóstico como método biológico, para diagnosticar etiológicamente la enfermedad de Chagas.

Se señala que los estadios ninfales cuarto y quinto son los más apropiados, no sólo por la gran cantidad de sangre que ingurgitan, sino por la facilidad en las manipulaciones de rutina.

Se señala la comida parcial de sangre para evitar que las ninfas de quinto estadio pasen a adultos.

Se describe la técnica utilizada para estudiar las deyecciones espontáneas en *Rhodnius prolixus* infectados experimentalmente, anotando sus ventajas.

Se describe una técnica original, para registrar la digestión total de sangre, "Deyectograma", en el transcurso de un mes, en ninfas normales e infectadas de quinto estadio. El aparato registrador es un termógrafo adaptado que llamamos "Deyectógrafo".

Se anotan algunas observaciones sobre el hallazgo de formas evolutivas de *S. cruzi* en diferentes deyecciones espontáneas y la supervivencia de formas metacíclicas en hialinas durante

30 horas entre lámina y laminilla, a temperatura de 15 grados centígrados.

Se llama la atención de la intermitencia en la expulsión de formas evolutivas, de *S. cruzi*, concluyendo que para evitar resultados falsos negativos, es necesario hacer, en tales casos, disección del tubo digestivo.

Se plantea la posibilidad de hacer estudios completos, facilitados por las técnicas expuestas, de acuerdo con escasas observaciones anotadas en experimentos pilotos.

SUMMARY

The efficiency of *Xenodiagnostico* is noted, as a biological method of making an etiological diagnosis of Chagas disease.

It is pointed out that the fourth and fifth nymph stages are the most appropriate, not only because of the great amount of blood which they ingurgitate to repletion, but also because of the facility of the routine operations without the necessity of extracting and placing the specimens in receptacles of superficial cleanliness in order to separate the full specimens from the empty ones.

The advantages of a partial diet of blood is indicated in order to prevent the nymphs from becoming adults.

The technique used in the study of spontaneous dejection in *Rhodnius prolixus* experimentally infected is described and the advantages noted.

The article describes an original method "Dejectograma" of recording the total digestion of blood during one month in normal and infected fifth stage nymphs. The recording apparatus is an adapted thermograph which we call a "Dejectografo".

Some observations are made concerning the discovery of evolved forms of *S. cruzi*, in several spontaneous dejections and the survival of meta-

cyclic forms in hyaline for 30 hours between the slide and cover slide at a temperature of 15° C.

Attention is called to the intermission of ejection of evolved forms of *S. cruzi*, with the conclusion that in order to avoid false negative results,

dissection of the digestive tracts is necessary in these cases.

The possibility of complete studies is set forth, aided by the techniques explained, and along the lines of the few observations made from pilot experiments.

BIBLIOGRAFIA

- (1) BRUMPT E. - 1914. *Le xenodiagnostic. Application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier a la Trypanosomose de Chagas.* Bull. Soc. Path. Exot. Año 7, 706-710.
- (2) OTÁLORA B. - 1942. Informe sobre 512 xenodiagnósticos en algunas personas del oriente de Cundinamarca y Boyacá. *Rev. Hig. Bogotá.* Vol. 23, 19-30.
- (3) USINGER W. E. - 1944. *The Triatominae of North and Central America and the West Indies and their public Health significance.* U. S. Pub. Health Serv. Bull. 288.
- (4) MUÑOZ T. - 1945. *Formas intermediarias del Tripanosoma cruzi: En la cavidad general de Rhodnius prolixus Stabl.* Tesis. Bogotá. Univ. Nal.
- (5) OTÁLORA B. - 1946. *Tres nuevos casos de la enfermedad de Chagas en el país; comprobados primero al xenodiagnóstico y luego por hemocultivo.* Rev. Col. de Pediat. 5.
- (6) DÍAZ VÁSQUEZ ANGEL. - 1960. *Consideraciones epidemiológicas de la Enfermedad de Chagas.* Arch. Venez. de Medicina Trop. y Parasit. Med. Vol. III, N° 2.
- (7) GUTIÉRREZ HOYOS YEZID. - 1962. *Contribución al conocimiento de las tripanosomiasis humanas en Colombia.* *Caldas Médico.* Vol. III, 39-56.
- (8) WIGGLESWORTH V. B. - (Sin fecha). *The principles of Insect Physiology.*

FIGURA 1 – Tarugos de "guadua" y estuche para el transporte en investigaciones de campo.

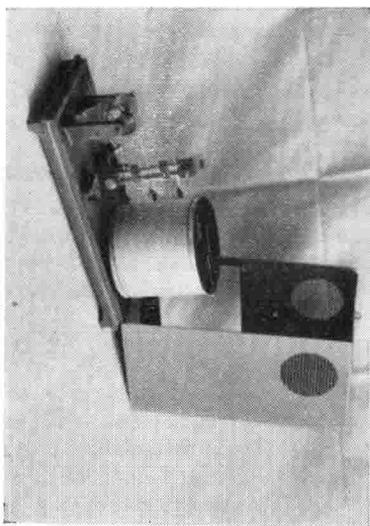
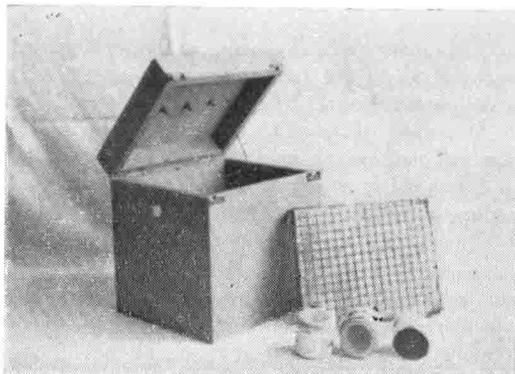
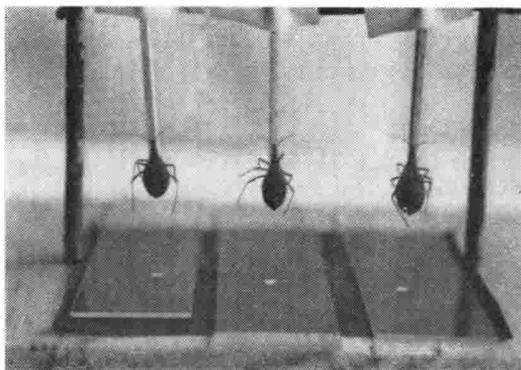


FIGURA 2 – Deyectógrafo

FIGURA 3 – Dispositivo de fijación para el control de los ejemplares infectados.



PRIMER EXPERIMENTO PILOTO

Semanas:

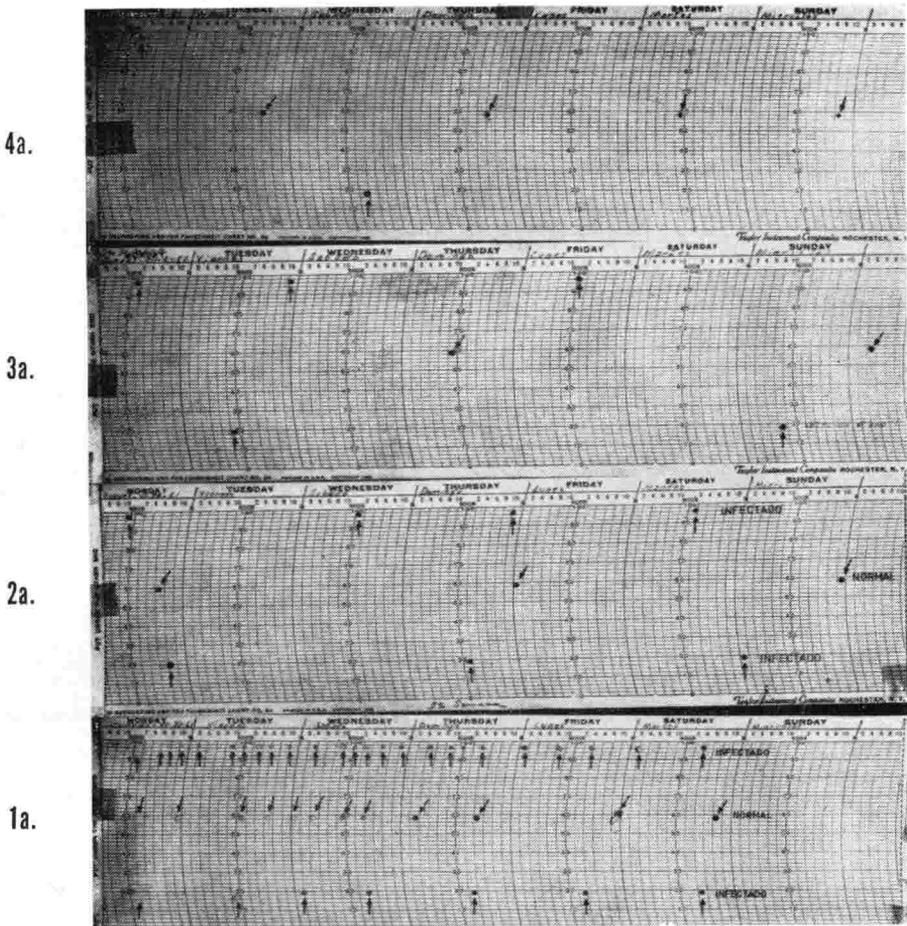


FIGURA 4 - "Deyectograma" de la digestion total de sangre, hasta la transformación en adultos, de tres ninfas de *R. prolixus* de 5o. estadio. Se nota un aumento en la frecuencia de las deyecciones en uno de los dos ejemplares infectados con *S. cruzi* durante la primera semana.

SEGUNDO EXPERIMENTO PILOTO

Semanas:

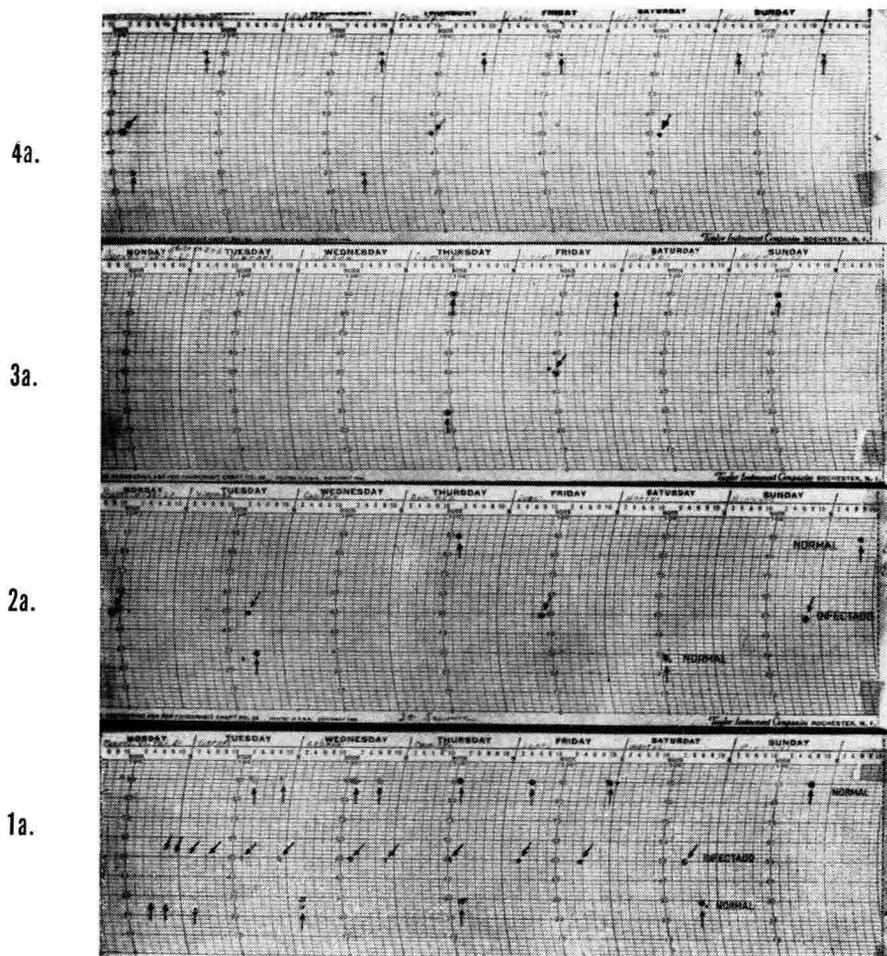


FIGURA 5 - "Delectograma" de la digestión total de sangre, hasta la transformación en adultos, de tres ninfas de *R. prolixus* de 5o. estadio. Se nota un aumento en la frecuencia de las deyecciones en el ejemplar infectado con *S. cruzi* durante la primera semana.