

COMUNICACIONES BREVES:

AISLAMIENTO DE TRYPANOSOMAS A PARTIR DE MATERIA FECAL DE *Rhodnius prolixus*

SOFIA DUQUE BELTRAN*, DIOSELINA PELAEZ CARVAJAL**, LUIS EDUARDO GUALDRON MARTINEZ*,
ELSA VILLARREAL PINILLA**, AUGUSTO CORREDOR ARJONA***

Se describe una metodología para el aislamiento de *Trypanosoma sp.* a partir de deyecciones de *Rhodnius prolixus* infectados con Trypanosomas. Básicamente se emplea antibióticos y antimicóticos que inhiben el crecimiento de bacterias y hongos permitiendo así el crecimiento de los Trypanosomas. Se demuestra la importancia de ésta metodología en las encuestas de vectores.

INTRODUCCION

La recuperación de cepas de *Trypanosoma cruzi* a partir de las deyecciones de los triatomíneos vectores, corrientemente se hace por inoculación de éstas a los ratones en los cuales no siempre se logra, ya que muchas veces sólo se encuentran flagelados de la forma epimastigota sin metacíclicos, que son las formas infectantes. En los triatomíneos infectados con *Trypanosoma rangeli* las formas infectantes las encontramos en las glándulas salivares del *Rhodnius prolixus* y formas epimastigotas en las heces. En muchas regiones se encuentran infecciones mixtas por *T. cruzi* y *T. rangeli* que dificultan la identificación del primero. El aislamiento de las cepas por medio del cultivo de las deyecciones de los triatomíneos con flagelados, objeto de este trabajo, obvia los inconvenientes que se tienen con la inoculación al ratón y permiten tanto la identificación de *T. cruzi* como de *T. rangeli*.

El aislamiento, cultivo e identificación de los Trypanomas son importantes desde el punto de vista clínico y epidemiológico.

MATERIALES Y METODOS

Rhodnius prolixus

Se utilizaron tanto los recolectados en su habitat natural como los infectados en el laboratorio a través de xenodiagnóstico.

Medios de cultivo para flagelados de la Familia Trypanosomatidae

NNN modificado (1)
Maekelt (2)
Tobie (3)
RE I modificado (1)

Aislamiento de Trypanosomas a partir de materia fecal de *Rhodnius prolixus*

Las heces de *Rhodnius prolixus* son observadas después de quince días de haber transcurrido la infección artificialmente o el mismo día o al día siguiente cuando provienen de zonas rurales.

* Biólogos, Grupo de Parasitología, Instituto Nacional de Salud.

** Bacteriólogos, Grupo de Parasitología, Instituto Nacional de Salud.

***M.D. Jefe Grupo de Parasitología, Instituto Nacional de Salud. Profesor, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia.

Si en las heces se observan flagelados se procede al aislamiento de ellos. La parte posterior del vector es lavada en solución salina fisiológica estéril que contiene 500 ugr/ml de 5-fluorocytosine. Se hace defecar al vector para la obtención de las heces las cuales son recogidas en una mezcla de 0.6 ml en proporción 1:2 de gentamicina 70 ugr/ml y 5-fluorocytosine 500 ugr/ml ambas disueltas previamente en solución salina fisiológica estéril. Se homogeniza la preparación y se procede a la inoculación de alícuotas iguales en tres tubos que contienen NNN modificado y otra alícuota se utiliza para cultivo bacteriano y posterior antibiograma.

Cada 24 horas los tubos se deben observar para comprobar la esterilidad. Si se encuentran hongos o bacterias se hace necesaria la descontaminación mediante pases sucesivos, hasta la purificación del cultivo, empleando el antibiótico o el antimicótico necesario según sea el estudio del antibiograma para bacterias o el empleo de 5-fluorocytosine en el caso de levaduras. Cuando el cultivo presenta hongos filamentosos se filtra el cultivo a través de algodón-gasa estéril.

Una vez purificada la cepa se adapta a un medio difásico que puede tener como fase sólida Maekelt o Tobie suplementado con una fase líquida nutritiva llamada RE I modificado con 2% de suero bovino; con ello se obtiene buen crecimiento de parásitos con el fin de elaborar cultivos en masa los que posteriormente son analizados isoenzimáticamente para la identificación bioquímica de la especie de *Trypanosoma* y finalmente las cepas son crioconservadas.

Antibiogramas

Se llevaron a cabo antibiogramas para conocer el antibiótico más efectivo contra las bacterias presentes en la materia fecal de *Rhodnius prolixus*. Los antibióticos utilizados fueron: penicilina, estreptomina y gentamicina en concentraciones de 20, 40, 70, 100 ugr/ml y la combinación de penicilina y estreptomina en las concentraciones anteriormente mencionadas.

RESULTADOS

Los antibióticos empleados para inhibir el crecimiento de las bacterias presentes en las heces de *Rhodnius prolixus* fueron efectivos en concentraciones de 100 ugr/ml para estreptomina, 100 UI/ml para penicilina y de 70 ugr/ml para gentamicina.

Cepas de *Trypanosoma sp.* aisladas mediante la metodología descrita:

1. Obtenidas a partir de vectores infectados naturalmente :

Código Internacional	Procedencia
IRHO/CO/85/Goteras	Guateque (Boyacá)
IRHO/CO/85/Llano Grande	Guateque (Boyacá)
IRHO/CO/85/Cantoras	Guateque (Boyacá)
IRHO/CO/85/Munanta	Guateque (Boyacá)
IRHO/CO/85/Tincachoque	Guateque (Boyacá)
IRHO/CO/85/Cucutilla	Cucutilla (N. de Santander)
IRHO/CO/87/003/Zulia	El Zulia (N. de Santander)

2. Obtenidas por xenodiagnóstico en mamíferos infectados naturalmente:

Código Internacional	Procedencia
MDID/CO/84/026	Arboledas (N. de Santander)
MDID/CO/85/108	Arboledas (N. de Santander)
MDID/CO/85/115	Arboledas (N. de Santander)
MDID/CO/86/210	Arboledas (N. de Santander)
MDID/CO/86/216	Arboledas (N. de Santander)
MRAT/CO/86/223	Arboledas (N. de Santander)
MDID/CO/86/246	Arboledas (N. de Santander)
MDID/CO/86/005/Zulia	El Zulia (N. de Santander)
MDID/CO/86/Zulia	El Zulia (N. de Santander)
MDID/CO/87/497	Durania (N. de Santander)

3. Obtenidas mediante xenodiagnóstico en pacientes.

Código Internacional	Procedencia
MHOM/CO/87/BML	Paratebueno (Cundinamarca)
MHOM/CO/87/SPR	Sábana Larga (Casanare)

DISCUSION

El cultivo in vitro de Trypanosomas a partir de deyecciones de triatomíneos permite la obtención directa de los Trypanosomas una vez que la contaminación con microorganismos ha sido combatida mediante el empleo de antibióticos y antimicóticos.

Este proceso permite no sólo el aislamiento de Trypanosomas a partir de los vectores que han sido capturados en su medio, sino también la obtención de aquellos a partir de xenodiagnósticos llevados a cabo tanto en animales como en pacientes.

Mediante esta metodología la obtención de cepas de *Trypanosoma sp.* es más segura que la llevada a cabo en ratones donde se corre el riesgo de no obtener infección. Además este método nos facilita la identificación de *Trypanosoma cruzi* y de *Trypanosoma rangeli* con facilidad, a partir de las deyecciones de los vectores.

El uso de la gentamicina y 5-fluorocytosine en las dosis expuestas mostró ser más efectivo que los antibióticos convencionalmente usados en el aislamiento de flagelados de la Familia Trypanosomatidae como penicilina y la estreptomycinina (4, 5, 6, 7).

SUMMARY

A methodology is described for isolating *Trypanosoma sp.* from feces of infected *Rhodnius prolixus*. The control of bacterial and fungal contamination was made by adding antibiotic and antimicotic agents which did not inhibit the growth of *Trypanosoma sp.* The importance of this methodology for vector surveys is shown.

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Ruben Santiago Nicholls O., Médico Grupo de Parasitología, del Instituto Nacional de Salud, por sus comentarios. A Hilda Guzmán Martínez,

Bióloga del Grupo de Parasitología del Instituto Nacional de Salud, por sus colecciones de campo.

Este trabajo se realizó con los auspicios del Instituto Nacional de Salud de Colombia.

BIBLIOGRAFIA

1. Duque S, Cáceres E, Corredor A. Comportamiento de flagelados de la familia Trypanosomatidae en dos medios de cultivo modificados. En prensa.
2. Mækelt GA. Die komplementbindungsreaktion der Chagas Krankheit. Z Tropenmed Parasitol 1960; 11: 152.
3. Sánchez ME, Ramírez RS. La posible diferenciación de las infecciones causadas por los Trypanosomas *cruzi* y *rangeli* por la técnica inmunoenzimática ELISA. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, Departamento de Química.
4. Chia-Tung, P. Cultivation of the leishmaniform stage of *Trypanoma cruzi* in cell-free media at different temperatures. Am J Trop Med and Hyg. 1968; 17(6): 823.
5. Hockmeyer WT, Kager PA, Rees PH, Hendricks LD. The culture of *Leishmania donovani* in Schneider's insect medium: its value in the diagnosis and management of patients with visceral leishmaniasis. Trans Royal Soc Trop Med and Hyg. 1981; 75(6): 861.
6. Ray R, Ghose AC. Cultivation of *Leishmania donovani* in vitro in a high yielding liquid culture medium. Indian J Med Res 1980; 71: 203.
7. Kimber CD, Evans DA, Robinson BL, Peters W. Control of Yeast contamination with 5-fluorocytosine in the in vitro cultivation of *Leishmania sp.* Annals Trop Med and Par. 1981; 75(4): 453.