

TECNICA PARA EXTRAER CANTIDAD APRECIABLE DE HEMOLINFA Y SACAR FACILMENTE GLANDULAS SALIVALES EN NINFAS DE QUINTO ESTADIO Y ADULTOS DE RHODNIUS PROLIXUS (1)

Por

Ernesto Osorno Mesa, M. D. *

Con motivo de una encuesta epidemiológica sobre tripanosomiasis, verificada hace aproximadamente dos años y medio, en la vereda de Pizarreal, Municipio de Villa del Rosario, Norte de Santander (1), encuesta en la cual se cubrió el universo humano, se observó, por el xenodiagnóstico natural y artificial, la importancia que tiene el estudio de las formas evolutivas de *Tripanosoma rangeli* en el tubo digestivo, hemolinfa y glándulas salivales del hospedero invertebrado *Rhodnius prolixus* Stal y la necesidad de encontrar una técnica de fácil realización para tal fin.

Posteriormente a nuestra publicación D'Alessandro (2) recalca sobre este tópico.

Hasta ahora, los métodos empleados para obtención de hemolinfa, en estos insectos, se fundamentan en la amputación total o parcial de las patas.

Barth (3), en el estudio sobre hemocitos, las amputa a nivel de las

coxas, fijando el ejemplar con una pinza a lo largo de la línea media ventral, para después comprimir ligeramente el abdomen con otra pinza. Otros autores seccionan la extremidad de una de las patas del primer par (2).

El método de Barth tiene la ventaja de aprovechar más cantidad de hemolinfa, evitando el movimiento de la pata, cuando se corta apenas la extremidad de ésta, con el peligro de perder la pequeña gota de exudado. La sección de la extremidad distal de cualquier apéndice se utiliza, en la presente técnica, para controlar la positividad o negatividad de la parasitemia en el insecto, a semejanza de la utilización de la cola en el ratón.

La presente técnica se basa en la relativa movilidad del protergum, cuyo desalojamiento hacia arriba y hacia adelante, deja al descubierto una amplia área membranosa intersegmental (4). A través de esta membrana se aprecia la cavidad general del tórax con los órganos correspondientes bañados por la hemolinfa; y al hacer presión, sobre el abdomen, afluye a dicha área la hemolinfa, que contiene el organismo del insecto, al mismo tiempo que ascienden las glándulas salivales,

(1) Presentado al Primer Congreso de Parasitología y Segundo de Medicina Tropical, reunido en Medellín, abril de 1965.

* Jefe de la Sección de Entomología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, Colombia.

de color rojizo pálido, nítida y totalmente visibles.

El ejemplar, activo o anestesiado, se fija a un portaobjetos, por la cara ventral, sobre un pedazo de mondadientes debajo del tórax, de modo que quede en ligera flexión para facilitar la extracción de hemolinfa y sacar las glándulas de la saliva. La fijación se hace con una banda de papel adhesivo en la cabeza y otra en el abdomen, que al quitarlas, no deja pegante en los tegumentos del insecto. (Fig. 1). Antes de fijarlo al portaobjeto, se le pone una película de cemento duco que cubra totalmente los tres últimos segmentos abdominales, para evitar que al comprimir esta región, salga contenido intestinal y disminuya la fuerza de propulsión hacia adelante. Para impedir el deslizamiento del portaobjetos colocado en posición longitudinal al observador, se fija a la platina del estereoscópico con papel adhesivo o con una gota de agua entre el portaobjetos y la platina, teniendo el cuidado de que dichas superficies estén bien desengrasadas, para mejor cohesión.

PROCEDIMIENTO

Con aumento de 9 x 1 se levanta suavemente el protergum por medio de una aguja encabada, gruesa y roma, sostenida con la mano izquierda y con una micropipeta de punta muy adelgazada, se perfora la membrana con movimiento circular para evitar desgarraduras y mayor traumatismo. (Figura 2).

Si hay suficiente hemolinfa, ésta asciende en la micropipeta en cantidad muy apreciable, aun en ejemplares en ayuno.

La punción y aun la amputación del protergum en nada perjudica la fisiología del insecto, tanto en la ovoposi-

ción como en las subsiguientes comidas de sangre. Pocas horas después de la punción los hemocitos (coagulocitos) se acumulan para formar un tapón que más tarde se solidifica sobre la perforación, (5) protegida nuevamente al bajar el protergum.

Para extraer las glándulas salivales, tanto en los adultos como en ninfas de quinto estadio, se quitan el protergum y la membrana intersegmental, se presiona el abdomen, se extrae hemolinfa y con una pinza fina se agarran los tejidos circundantes adelante o atrás de las glándulas para sacarlas desbridándolas, detrás de la pinza con una aguja, colocándolas en lámina excavada con solución salina fisiológica para limpiarlas.

Con esta técnica hemos obtenido, con pleno éxito, cultivos en medio de Pifano y mejor en medio de Tobi, tanto de hemolinfa como de contenido glandular muy ricos en formas leptomonas a los dos repiques, para luego el paso por Zeledon, con el objeto de comprobar si se trata o no de *T. rangeli*. Las siembras se hacen previa esterilización del material empleado y sumersión del ejemplar o ejemplares en solución acuosa de fenol al 0.5%.

Otra de las aplicaciones de este método es la de facilitar la inoculación, de formas flageladas, en la cavidad general del tórax, extrayendo previamente, con la micropipeta, bastante hemolinfa para disminuir la presión y así evitar salida del inóculo.

Para los trabajos que actualmente adelantamos en el Instituto Nacional de Salud, sobre tripanosomiasis, nos ha sido muy útil, máxime que no contamos, por ahora, con colonia de ratones genéticamente seleccionados.

La presente técnica complementa otra sobre siembra de deyecciones hialinas (6).

RESUMEN

Se describen minuciosamente los diferentes pasos para extracción de hemolinfa con micropipetas, en ninfas de 5º estadio y adultos de *Rhodnius prolixus*, lo mismo que para el aislamiento de las glándulas salivales.

Se anotan las ventajas y aplicaciones de estas técnicas, en investigaciones

parasitológicas, especialmente sobre Trypanosomiasis.

Agradecimientos. - Damos agradecimientos a las señorita Alicia Gaitán C., de la Sección de Parasitología, por las aplicaciones de la técnica descrita, y al señor Guillermo Varela S., por las ilustraciones esquemáticas.

BIBLIOGRAFIA

1. Osorno-Mesa E.; Giraldo C. L. E.; Corredor A. A., 1963. — "Encuesta epidemiológica para la enfermedad de Chagas en la vereda de Pizarreal, Norte de Santander. Resultado de las pruebas de gota gruesa y xenodiagnóstico natural y artificial en la población general de Pizarreal, Municipio de Villa del Rosario, Norte de Santander". Rev. Fac. Med. Bogotá, 31, Nº 2, pp. 65-73.
2. D'Alessandro B. A., M. D., Ph. D., M. P. H. T. M., 1963. — "The Life Cycle of Trypanosoma rangeli in Triatomid Bugs as it occurs in nature". The Bulletin of the Tulane University Medical Faculty, 23 Nº 1, pp. 21-30.
3. Barth R., 1959. — "Estudios anatómicos e histológicos sobre a subfamilia triatominae (heteroptera, reduviidae). XI parte: Observações histológicas na hemolinfa de triatoma infestans". Anais do Congresso Internacional sobre a Doença de Chagas. Volumen I. Rio de Janeiro, pp. 129-139.
4. Snodgrass, R. E., 1935. — "Principles of insect morphology". Chapter IV, pp. 73-80.
5. Steinhaus E. A., 1949. — "Principles of insect pathology". Chapter 2, pp. 17-22.
6. Osorno-Mesa E.; y Osorno-Mesa H. (+), 1963. — "Técnica para obtener deyecciones hialinas como inóculo y para microanálisis, con ninfas de quinto estadio de *R. prolixus*, infectadas y normales". Rev. Fac. Med. Bogotá, 31 Nº 2, pp. 51-53.

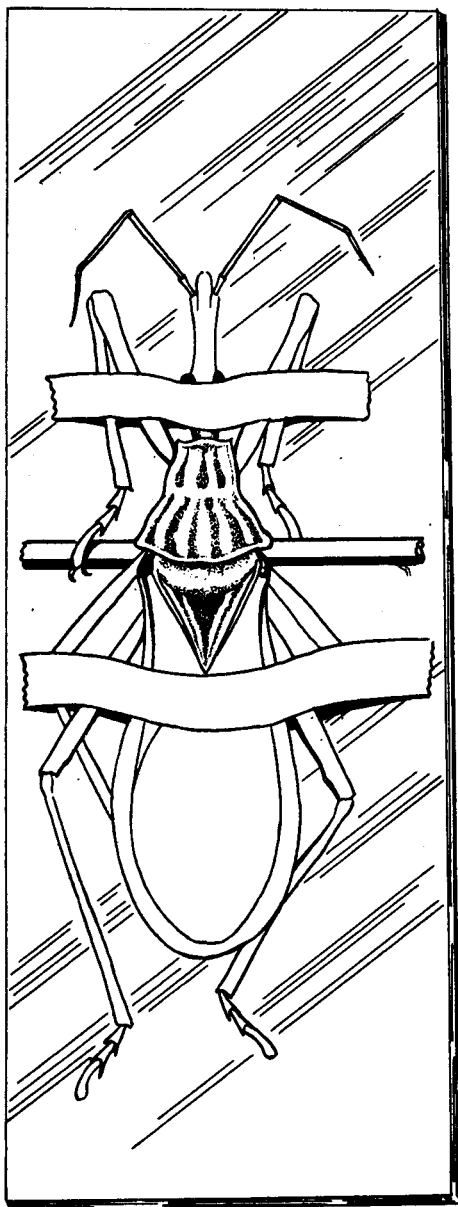


Fig. 1 Fijación del ejemplar al portaobjeto.

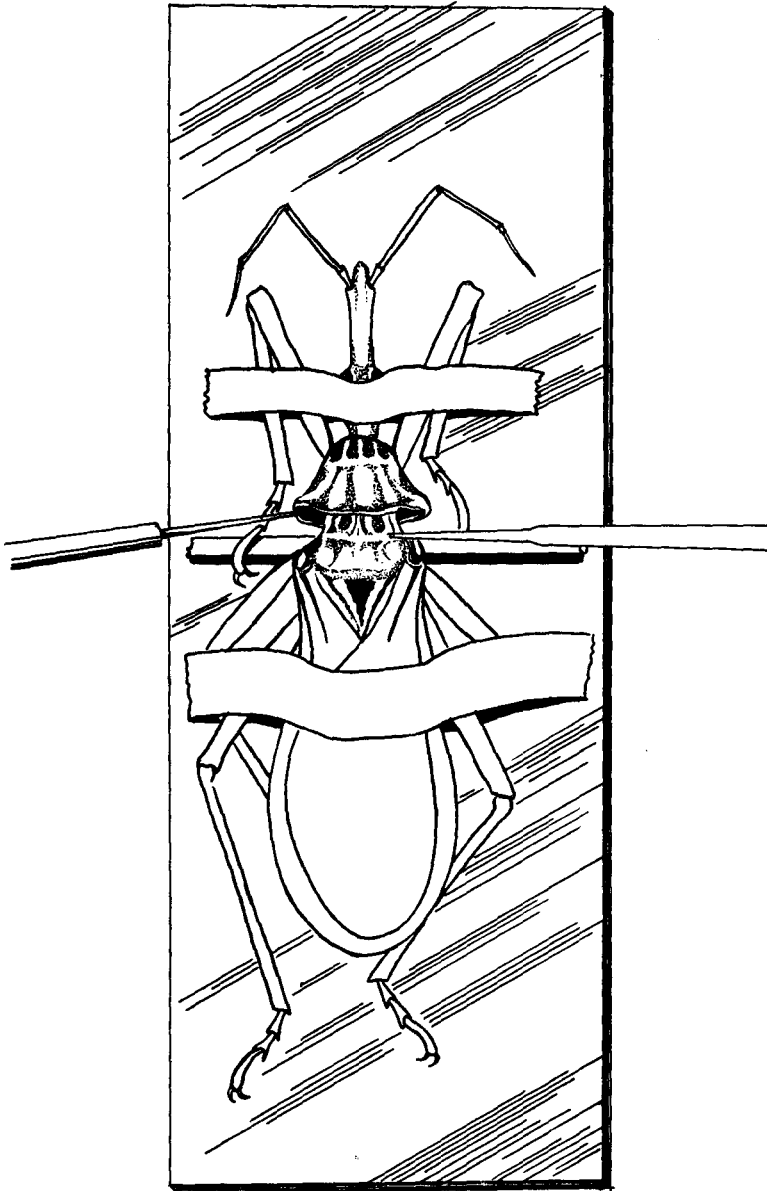


Fig. 2 Levantamiento del pronotum y punción con micropipeta de la membrana intersegmental.