



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
PROGRAMA DE CIENCIAS QUIMICOBIOLOGICAS**

**Estudio de la susceptibilidad de triatominos
(Hemiptera: Reduviidae) mexicanos
a *Trypanosoma cruzi* cepa NINOA**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICOBIOLOGICAS
P R E S E N T A :
M.C.P. JOSÉ MANUEL PÉREZ RIVERO**

DIRECTOR:

Dr. RICARDO ALEJANDRE AGUILAR



México D.F.

Diciembre 2010

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio de Entomología del Departamento de Parasitología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Ricardo Alejandro Aguilar. Para el desarrollo del proyecto se recibió apoyo del Consejo nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), del Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) del IPN y del Instituto Carso Salud.

*Un simple agradecimiento resulta injusto e
insuficiente para agradecer a todos a quienes
tengo algo que agradecer, todo lo que les tengo
que agradecer...*

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	1
ÍNDICE DE FIGURAS	2
ÍNDICE DE TABLAS	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
I.- INTRODUCCIÓN.....	1
I.I CICLO DE VIDA.....	1
I.II PATOLOGÍA.....	2
I.III DIAGNÓSTICO.....	4
I.IV TRANSMISORES.....	6
II.- ANTECEDENTES	9
III.- JUSTIFICACIÓN	13
IV.- OBJETIVOS.....	14
IVa.- OBJETIVO GENERAL	14
IVb.- OBJETIVOS PARTICULARES.....	14
V.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
V.I MATERIAL BIOLÓGICO	15
V.II CULTIVO DE TRIATOMINOS.....	18
V.III ALIMENTACIÓN	18
V.IV OBTENCIÓN DE PARÁSITOS	20
V.V INFECCIÓN Y REVISIÓN	20
V.VI ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	21
VI.- RESULTADOS.....	23
VII.- DISCUSIÓN	30
VIII.- CONCLUSIONES.....	36
IX.- SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS	37
X.- BIBLIOGRAFÍA.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
2	Fases del ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
3	Ciclo de vida de <i>Meccus pallidipennis</i>	8
4	Adultos de las especies utilizadas	17
5	Ninfas de primer y tercer estadio	19
6	Alimentación de triatominos	22
7	Xenodiagnóstico artificial	22
8	Compresión abdominal	22
9	Gráfica 1	25
10	Gráfica 2	26
11	Gráfica 3	27
12	Gráfica 4	28
13	Deyecciones con parásitos	28
14	Gráfica 5	29
15	Gráfica 6	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Cantidad de triatomos positivos y negativos en los experimentos A y B	23
2	Cantidad y porcentaje de triatomos infectados y no infectados de cada especie y en cada estadio	24

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es una antropozoonosis causada por *Trypanosoma cruzi*. La fase aguda puede pasar inadvertida, pero durante la fase crónica los problemas viscerales repercuten severamente en la calidad de vida del individuo y la afección cardíaca puede ser mortal. El diagnóstico parasitológico que ha demostrado tener mejores resultados es el xenodiagnóstico del cual hay una variante denominada xenodiagnóstico artificial que consiste en extraer sangre de individuos sospechosos de padecer esta entidad nosológica y alimentar con esta sangre triatomíneos cultivados en laboratorio y libres de infección. Con el fin de determinar la especie de triatómimo más adecuada para llevar a cabo este estudio en México, evaluamos la susceptibilidad del primer y tercer estadio de ocho especies a la infección con *Trypanosoma cruzi* cepa NINOA utilizando una cantidad de 5 000 parásitos por ml. para la infección. Las especies que utilizamos fueron *Dipetalogaster maximus*, *Meccus bassolsae*, *M. pallidipennis*, *M. phyllosomus*, *M. picturatus*, *Triatoma infestans*, *T. lecticularia* y *T. mexicana*. Los criterios que se utilizaron para establecer la susceptibilidad fueron: a) porcentaje de triatóminos infectados, b) densidad de parásitos en heces y c) cantidad de sangre ingerida. En los resultados no encontramos, en ninguna de las especies estudiadas encontramos diferencia estadísticamente significativa entre el primer y el tercer estadio. Los resultados obtenidos sugieren el siguiente orden de susceptibilidad $M. bassolsae > M. pallidipennis = T. mexicana > D. maximus > M. picturatus > T. infestans = T. lecticularia > M. phyllosomus$. Adicionalmente es posible comentar que las especies *Meccus bassolsae* y *M. pallidipennis* presentan ciertas ventajas debido a una mayor facilidad para la manipulación experimental.

ABSTRACT

Chagas' disease is an antropozoonosis caused by *Trypanosoma cruzi*. The acute phase may not be symptomatic, but in the chronic phase visceral disease severely affects quality of life and cardiac illness may result in patients death. The parasitological diagnosis that has the best results is the xenodiagnosis, a variant of this is called artificial xenodiagnosis, this is conducted by taking a blood sample from the patient, and this blood is used to feed some uninfected lab cultured triatomins. In order to determinate the most suitable species for xenodiagnosis of the Chagas' disease in Mexico, the susceptibility to infection with *Trypanosoma cruzi* of first and third instar nymphs from eight species of triatomines was evaluated. The NINOA strain of *T. cruzi* was employed at 5 000 parasites per ml. The species under testing were *Dipetalogaster maximus*, *Meccus bassolsae*, *M. pallidipennis*, *M. phyllosomus*, *M. picturatus*, *Triatoma infestans*, *T. lecticularia* and *T. mexicana*. The criteria for determining the infection susceptibility were: A) percentage of infected triatomines, b) Parasite density in triatomine feces, and c) blood meal size. There is no statistical differences in susceptibility to infection between the first and third instar nymphs. The results suggest the following order of susceptibility: *M. bassolsae* > *M. pallidipennis* = *T. mexicana* > *D. maximus* > *M. picturatus* > *T. infestans* = *T. lecticularia* > *M. phyllosomus*. In addition, *M. bassolsae* and *M. pallidipennis* appear more suitable for lab manipulation.

I.- INTRODUCCIÓN

La tripanosomiasis americana, mejor conocida como enfermedad de Chagas, en honor a su descubridor Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas, es una antropozoonosis que causa una parasitemia que puede ir del estado agudo al crónico, pasando por una fase intermedia denominada indeterminada, y tiene como agente etiológico a *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909). La importancia de esta zoonosis radica en su amplia distribución geográfica que va desde el Sur de Estados Unidos hasta Argentina y Chile, (O.P.S. 1984; CDC 2009), la amplia extensión de los transmisores en el Continente Americano, la alta mortalidad que presenta, siendo, después de la malaria, la segunda parasitosis transmitida por artrópodos en orden de frecuencia, afectando a alrededor de 16 millones de individuos y se estima que existen cerca de de 100 millones de personas en riesgo en América Latina (Coura 2007). Su trascendencia radica, también, en que la infección es incurable, salvo durante la primera fase, los datos de remisiones espontaneas son escasos, la quimioterapia deja mucho que desear y no hay vacunas (Coura y De Castro 2002); el control depende mucho de la eliminación de las poblaciones domésticas de los insectos transmisores pero el control de estos por medio de insecticidas es muy costoso (Brener 1987; W.H.O. 1990; Harwood y James 1993; Francolino *et al.* 2003).

I.I CICLO DE VIDA

Los transmisores de *T. cruzi* se infectan al ingerir sangre del hombre o de mamíferos que presentan tripomastigotes sanguíneos. Estas formas sufren transformaciones a lo largo de tubo digestivo del transmisor, una vez en el intestino medio toman la forma de epimastigotes, que se multiplican intensamente por fisión binaria, y cuando llegan al

intestino posterior presentan forma de tripomastigote denominados metacíclicos, infectantes para el huésped vertebrado. Por lo general el vector se torna infectante entre los 15 y 30 días posteriores a la ingestión de sangre infectada y permanece así el resto de su vida (Kirchhoff 1993; Atias 1998; Botero y Restrepo 2003; Chester-Beaver *et al.* 2003; Garcia *et al.* 2010).

Los triatominos infectados, al picar nuevamente al hombre o a los animales, posterior a una abundante ingesta de sangre y en un tiempo que depende de la especie de triatomo, suelen defecar sobre la superficie (Zeledón *et al.* 1977; Zárate *et al.* 1984; Noguera-Torres *et al.* 2000). Cuando estas deyecciones, que presentan tripomastigotes metacíclicos, tienen contacto con el sitio de la picadura, con una mucosa, con la conjuntiva, o con una dermoabrasión secundaria al rascado producto de la irritación generada por la picadura del insecto (Mott *et al.* 1980) se presenta una contaminación estercoraria (Kirchhoff 1993; Flisser y Perez-Tamayo 2006), dando lugar a la entrada del parásito al nuevo hospedero (Botero y Restrepo 2003) (Fig. 1)

I.II PATOLOGÍA

Cuando los tripomastigotes metacíclicos entran en el organismo son fagocitados por los macrófagos de la región y englobados en el fagosoma de donde escapan y se dirigen al citoplasma, donde se convierten en amastigotes y se multiplican activamente por fisión binaria. Posteriormente se diferencian de nuevo en tripomastigotes que lisan a la célula hospedera y llegan a la circulación sanguínea y linfática, para luego invadir varios órganos,

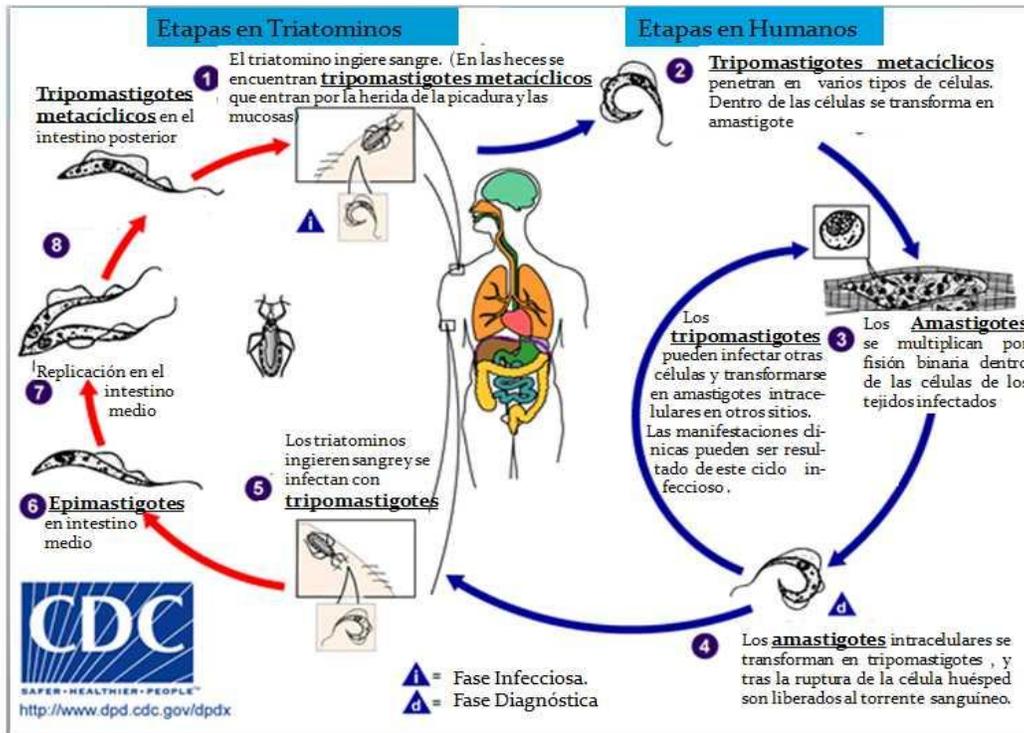


Fig. 1: Ciclo de vida de *T. cruzi* (CDC 2009) (Modificada por el autor)

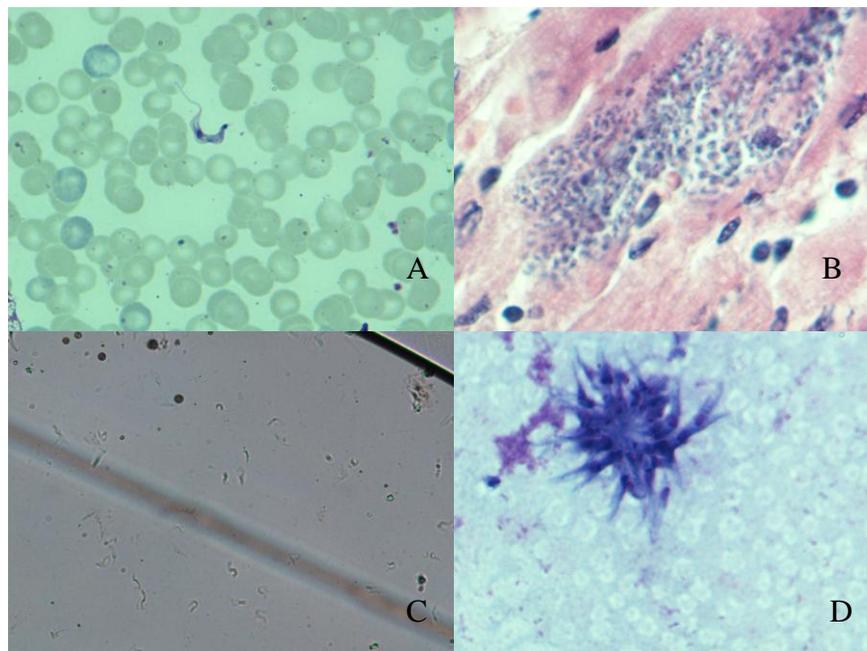


Fig. 2 Fases del ciclo de vida de *T. cruzi*. (Original del Autor)

A) Tripomastigote sanguíneo rodeado de eritrocitos (1000x). B) Nido de amastigotes en tejido cardiaco (1000x) C) Tripomastigotes metacíclicos en una deyección (200X). D) Racimo de epimastigotes en medio de cultivo (1000X).

en cuyas células penetran y se transforman de nuevo en amastigotes (Kollien y Schaub 2000). Este momento es la etapa aguda de la enfermedad que dura de 10 a 15 días aproximadamente y se caracteriza por una intensa multiplicación parasitaria en los tejidos, elevada parasitemia, linfadenitis regional, con un índice de mortalidad del 10 % debido a miocarditis o meningoencefalitis. Posterior a esto ocurre una respuesta inmune que provoca disminución de la parasitemia y mantiene la infección en algunos puntos selectivos, dando pie al denominado periodo indeterminado, que dura aproximadamente 10 años, inter en el cual el individuo es asintomático, a pesar de que las alteraciones inician en el corazón y el tubo digestivo, y que termina cuando aparecen los primeros síntomas e inicia la fase crónica, en el cual la parasitemia suele ser mínima, predomina el parasitismo tisular y la producción de antígenos, se encuentra cardiopatía chagásica que se caracteriza por miocarditis, cardiomegalia, adelgazamiento de las paredescardiacas, aneurismas apicales, formación de trombos intramurales y alteraciones en la conductividad cardíaca; y lesiones hipertróficas del tubo digestivo o viceromegalias, especialmente megacolon y megaesófago debido a la destrucción de las neuronas del plexo intramural, principalmente el de Auerbach (López-Antuñano *et al.* 2000; Botero y Restrepo 2003; Coura 2007; CDC 2009) y en algunos casos se han reportado alteraciones de la vejiga, los uréteres y la vesícula biliar (Andrade y Andrade 1966).

I.III DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de laboratorio se realiza por métodos parasitológicos y serológicos. Dentro de los exámenes serológicos se encuentran Hemaglitinación Indirecta, Inmunofluorecencia Indirecta, Western Blot y ELISA. En el diagnóstico parasitológico directo contamos con el examen en fresco, gota gruesa, frotis sanguíneo, centrifugado,

biopsia de ganglios y músculos; y en el indirecto se encuentran el xenodiagnóstico, el hemocultivo y la inoculación de animales de laboratorio (López-Antuñano *et al.* 2000; Ferreira *et al.* 2001; Carrada-Bravo 2004). Actualmente, con el desarrollo de la biología molecular se cuenta con la herramienta de la Reacción en Cadena de la Polimerasa -PCR-, (Britto 2009).

El xenodiagnóstico es la técnica parasitológica más sensible para el diagnóstico de la tripanosomiasis americana, alcanzando el 100 % en el estado agudo de la enfermedad, cuando la parasitemia está presente, mientras que en el estado crónico o indeterminado, momentos en que la parasitemia es subpatente, se encuentra entre el 17 % y el 70 % (Pifano 1954; Freitas 1961; Salgado 1969; Minter *et al.* 1978; Fistein y Chowdhury 1980; Alejandre-Aguilar *et al.* 1993). Su amplia utilidad va desde los fines diagnósticos, hasta su empleo para el aislamiento de cepas de *T. cruzi* a partir de casos humanos y reservorios, la evaluación de quimioterapias mediante el seguimiento de la parasitemia durante el tratamiento, comparar la especificidad y la sensibilidad de pruebas serológicas al comparar pruebas negativas con xenodiagnósticos positivos y viceversa, y casos de alteraciones cardiacas o viceromegalias y serología negativa en regiones endémicas (Rebosolán 1969; Schenone *et al.* 1969; Perlowagora-Szumlewicz y Müller 1987; Pereira *et al.* 1989; López-Antuñano *et al.* 2000; Apt *et al.* 2005; Pinto *et al.* 2009). El método consiste en alimentar triatominos, cultivados en el laboratorio y libres de la infección con *T. cruzi*, con sangre de individuos sospechosos de padecer la infección, utilizándolos como un medio de cultivo biológico (Schenone 1999) y posterior a un periodo de incubación revisar las deyecciones, que de presentar parásitos, la prueba resulta positiva (Bumpt 1914; Schenone *et al.* 1968; Neal y Miles 1977; Segura 1987).

El xenodiagnóstico puede realizarse de manera directa (natural) o indirecta (artificial). En el primer caso se colocan los insectos en un recipiente apropiado y éste se coloca sobre la piel del paciente o el mamífero sospechoso, permitiendo la hematofagia. El segundo método se realiza obteniendo sangre venosa del probable enfermo y se deposita en un recipiente que es tapado con una membrana de látex a través de la cual los insectos ingieren sangre. En ambos casos la lectura del estudio se realiza a los 30, 60 y 90 días (Dias 1940; Schenone *et al.* 1968; Cedillos *et al.* 1982; Alejandre-Aguilar *et al.* 1993).

I.IV TRANSMISORES

Los transmisores son hemípteros (chinchas verdaderas) pertenecientes a la subfamilia Triatominae, son hemimetábolos, hematófagos obligados y transmisores potenciales durante todos los estadios de su desarrollo y la fase adulta. Son artrópodos aplanados dorsoventralmente, con una probóscide articulada, una cabeza pequeña, generalmente cilíndrica y alargada, poseen ojos compuestos, antenas divididas en cuatro artejos y lateralmente insertadas, articulaciones membranosas entre el segundo y tercer artejo del rostro. Los adultos se diferencian de las ninfas por la presencia de ocelos, genitales externos bien desarrollados y en la mayoría de los casos la presencia de alas anteriores y posteriores bien desarrolladas. Las hembras pueden ser reconocidas por el ápice abdominal truncado, en tanto que los machos se encuentra en forma redondeada, generalmente las hembras son más grandes que los machos (Fig. 3). Entre las herramientas que se utilizan para clasificarlos morfológicamente se encuentran: estructura general del cuerpo y coloración, tamaño y posición de las antenas, las alas, la cabeza y los genitales, entre otros. El tamaño del insecto, así como la coloración del cuerpo y el conxivo son las características más aparentes en la identificación, las coloraciones van desde amarillas hasta

negra, con manchas de diferentes tonalidades, como son anaranjadas, cafés, amarillas, blancas, rojas o grises (Lent y Wygodzinsky 1979; Harwood y James 1993).

Los triatominos viven en promedio entre uno y dos años, tardando de 3 a 8 meses en su evolución de huevo a adulto. Cada hembra, una vez fecundada, coloca de 150 a 250 huevos (fertilidad arriba del 95 %). Luego de 3 a 4 semanas, nacerán las ninfas. Durante el crecimiento ocurren 5 mudas denominados estadios ninfales (Lent y Wygodzinsky 1979; Harwood y James 1993; Chester-Beaver *et al.* 2003) (Fig. 3)



Fig. 3: Ciclo de vida de *Meccus pallidipennis* (Original del autor).

II.- ANTECEDENTES

Desde que Brumpt (1914), introdujo el xenodiagnóstico para el diagnóstico parasitológico de la enfermedad de Chagas, este procedimiento ha sido objeto de varias modificaciones. Su utilidad se basa en el uso del transmisor en individuos en quienes se sospecha la infección (Schenone *et al.* 1974). La base biológica de la técnica siempre es la misma, pero se le han hecho algunas modificaciones, como el número de triatomas, que pueden variar de 5 a 10 (Salgado 1969) hasta 30 o 40 (Castro *et al.* 2004), con la hipótesis que al incrementar el número de insectos se aumenta la sensibilidad de la prueba; así como las especies utilizadas, el estadio ninfal y la técnica empleada para obtener contenido intestinal que puede ser obteniendo un condensado de heces y examinarlas en conjunto, examinar triatomino por triatomino, realizar la disección del intestino o licuar a los insectos y posteriormente revisar el material drenado (Dias 1940; Meckelt 1964; Schenone *et al.* 1968; Salgado 1969; Rohwedder *et al.* 1970; Cerisola *et al.* 1971; Schenone *et al.* 1974; Cuba *et al.* 1978; Alejandre-Aguilar *et al.* 1993).

El primero en realizar estudios sobre susceptibilidad de triatominos a la infección con *T. cruzi* fue Dias en 1939, quien encontró, al realizar el xenodiagnóstico en algunos perros infectados con una cepa brasileña de *T. cruzi* que el 57.7 % de *Rhodnius prolixus* se infectaba, mientras que otras especies transmisoras de Brasil se infectaron en un 90.4 %. En México, Luis Mazzotti, en 1940 inició los estudios de susceptibilidad, pero fue hasta 1966 cuando se publicó que *T. barberi* fue más susceptible a la infección con cinco cepas de *T. cruzi* que *T. infestans* (Little *et al.* 1966).

Factores como la especie, el estadio, el volumen de sangre ingerida y las diferencias entre las cepas pueden afectar la multiplicación y diferenciación de tripanosoma en el insecto (Perlowagora-Szumlewicz y Müller 1982; Franco *et al.* 2002), y se ha propuesto, cuando no haya estudio previos de susceptibilidad, que se utilicen triatomino que correspondan a la especie prevalente en la región donde se está practicando el xenodiagnóstico (Cerisola *et al.* 1971; Alejandre-Aguilar *et al.* 1996).

Algunos autores sugieren que una ingestión de mayor volumen de sangre por los triatominos, ya sea aumentando el número de insectos en cada xenodiagnóstico o empleando la especie de mayor tamaño o estadios más avanzados debe significar un número mayor de tripomastigotes ingeridos y por consiguiente mejorar el rendimiento del xenodiagnóstico (Schenone *et al.* 1969; Schenone *et al.* 1974; Minter *et al.* 1977; Cuba *et al.* 1978; Cedillos *et al.* 1982; Junqueira *et al.* 1989; Franco *et al.* 2002; Castro *et al.* 2004). Esto tiene como desventaja que se requiere de una gran producción de insectos, más tiempo para su revisión, más recursos para su manutención, aunado a una mayor exanguinación, que si se trata de un aislamiento en un animal silvestre puede ocurrir una hipovolemia, su muerte y consecuentemente la pérdida de ese material de trabajo (Minter-Goedbloed y Minter 1987); y en caso de ser xenodiagnóstico directo sobre un paciente, se traduce en mayor molestia debido a las reacciones de hipersensibilidad a la saliva (Mott *et al.* 1980; Klotz *et al.* 2010). Otros factores, además del volumen de sangre ingerida pueden regular la susceptibilidad de los triatominos a *T. cruzi*, como por ejemplo las características fisiológicas del tubo digestivo, cepas del protozoario, edad y sexo de los insectos empleados (Phillips y Bertram 1967; Cuba *et al.* 1978).

Son pocos los trabajos realizados con insectos en primer estadio, y en la mayoría de éstos se empleó *D. maximus*, el triatomino más grande descrito hasta este momento, con resultados muy similares a los de otras especies en tercer estadio (Cuba *et al.* 1979; Marsden *et al.* 1979), también se ha trabajado con *Panstrongilus megistus*, *T. infestans* y *R. prolixus* en primer estadio con una susceptibilidad del 20 %, además de ser necesario alimentar varias veces a los triatominos sobre el paciente o sobre el mamífero sospechoso (Minter *et al.* 1977).

Sobre los mecanismos fundamentales de diferenciación de *T. cruzi* y la susceptibilidad de los insectos a la infección se conoce poco. Los estudios realizados sobre el mecanismo de reconocimiento específico sugieren que la relación huésped-parásito puede estar influenciada por varios factores. En el estómago del triatomino, el parásito se enfrenta a los componentes de la saliva, enzimas digestivas, cambios en la temperatura, osmolaridad y factores hemolíticos que pueden afectar a *T. cruzi*, además de aglutinas que permiten la aglutinación de algunas cepas, volviéndolas más infectivas. En el intestino del transmisor, algunos componentes como la cutícula, las microvellosidades, las membranas extracelulares y una lectina pueden afectar tanto al flagelo como al cuerpo celular del parásito, así como participar en la diferenciación de las diferentes fases del parásito (Pereira *et al.* 1981; Kollien y Schaub 2000). Se continúa afirmando que hay una grande y mutua adaptación entre los transmisores locales y *T. cruzi* (Pifano 1954; Schenone *et al.* 1974), pero otros resultados cuestionan que las especies locales en área endémicas de la enfermedad de Chagas, sean más susceptibles a la infección con cepas locales *T. cruzi* que las que no se encuentran en esa área (Barreto *et al.* 1978; Perlowagora-Szumlewicz y Müller 1982).

Algunos autores han investigado si las alimentaciones posteriores a la infección en los triatominos influyen para la reproducción de *T. cruzi* en el intestino de los mismos y han comprobado, al utilizar animales diferentes como fuente de alimentación que no existe ningún factor tripanolítico que pueda afectar el desarrollo y reproducción de los tripanosomas ingeridos (Urdaneta-Morales 1973). Aunque el tiempo de ayuno si parece afectar al desarrollo y diferenciación del parásito (Kollien y Schaub 2000).

III.- JUSTIFICACIÓN

El xenodiagnóstico es la técnica parasitológica más sensible, que a pesar de sus resultados de sensibilidad tan heterogéneos, tiene una especificidad del 100 %. Este es uno de los motivos por los cuales es importante estandarizar esta técnica, cuya importancia radica en el diagnóstico parasitológico de la enfermedad; en el aislamiento de cepas a partir de reservorios, sin poner en riesgo la vida del espécimen, y casos humanos lo que permite llevar a cabo estudios nuevos estudios de diversas índoles; el mantenimiento en laboratorio de cepas y comprobar la eficacia de los tratamientos en etapas crónicas, ya que los anticuerpos permanecen por largo tiempo en circulación.

Dada la importancia de la enfermedad y la importancia de la técnica se ha recomendado practicar estudios de susceptibilidad de las distintas especies de transmisores. Para aumentar el rendimiento deben considerarse todos los aspectos que pueden influir en la susceptibilidad de las especies a la infección con *T. cruzi* para elegir la especie y el estadio que resulte más conveniente para la práctica del xenodiagnóstico.

La ventaja que presenta el xenodiagnóstico indirecto, sobre el directo, es que no se expone a los pacientes a la reacción alérgica de la saliva de triatomino, que puede ir desde molestias cutáneas muy discretas hasta una reacción anafiláctica, además de eliminar el factor de la entomofobia que algunas personas presentan, el tiempo que invierte el paciente es menos ya que para la toma de sangre venosa se requieren tan solo cuatro o cinco minutos contra más de treinta minutos en caso del xenodiagnóstico directo, posibilidad de un mayor uso de especies y especímenes.

IV.- OBJETIVOS

IVa.- OBJETIVO GENERAL

Evaluar la susceptibilidad de especies de triatominos (Hemiptera: Reduviidae) a la infección con *Trypanosoma cruzi* cepa NINOA

IVb.- OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar cuál especie de triatomo puede ser recomendada para realizar xenodiagnóstico en México.
2. Evaluar en cuál de los estadios, I ó III, los triatominos son más susceptibles a infectarse con *T. cruzi*.

V.- MATERIAL Y MÉTODOS

V.I MATERIAL BIOLÓGICO

A lo largo de 9 meses de continuo trabajo se logró incrementar el número de ejemplares de cada especie a utilizar, obteniendo, en una primera etapa una cantidad de 45 triatominos por especie y por estadio (primero y tercero) cantidad con la cual se llevó a cabo el primer experimento, siendo estudiados únicamente 30 ejemplares de cada estadio y de cada especie. Cuatro meses posteriores, se obtuvieron cantidades idénticas a las antes mencionadas y se realizó una segunda prueba bajo las mismas condiciones, obteniendo así un experimento repetido. La razón por la cual se emplearon 45 triatominos y se revisaron 30 es porque algunos ejemplares mueren, no comen o se encuentran en periodo de ecdisis, situaciones que imposibilitaban su uso en el estudio; de este modo siempre se obtuvo un número homogéneo de observaciones.

Las especies de triatominos que se utilizaron fueron las siguientes:

Dipetalogaster maximus Usinger, 1939 (Fig. 4A): Recolectada en Baja California Sur, donadas por el Dr. José Alejandro Martínez Ibarra en 2005, desde entonces se mantienen en el laboratorio.

Meccus bassolsae Alejandre-Aguilar *et al.* 1999 (Fig. 4B): Descubierta en el Estado de Puebla, recolectada por el equipo de nuestro laboratorio en 1992 y cultivadas desde entonces.

M. pallidipennis Stål, 1872 (Fig. 4C): Reportada en Nayarit, Jalisco, Colima, Guerrero, Michoacán, México, Puebla, Morelos, Zacatecas, Querétaro y Veracruz, recolectadas en colonia Progreso, Municipio de Jiutepec, en el estado de Morelos por el equipo de este laboratorio en el año 2000.

M. phyllosomus Burmeister, 1835 (Fig. 4D): Documentada en Oaxaca capturada en Tehuantepec Oaxaca en 2005, siendo cultivada desde entonces en el laboratorio.

M. picturatus Usinger, 1939 (Fig. 4E): Localizada en Nayarit, Jalisco, Colima y Oaxaca colectada en Tepic Nayarit en 1990, mantenida desde este año por el equipo del laboratorio.

Triatoma infestans n.ssp. (Fig. 4F): Se reportó en Brasil, pero se han encontrado ejemplares en Los Tuxtlas, Veracruz, como una población silvestre, originada, seguramente a partir de una colonia de laboratorio (*Rocha et al. 2001*). La colonia utilizada fue donada en 1977 y criada desde ese año en el laboratorio.

T. lecticularia Stål, 1859 (Fig. 4G): Se encuentra en Nuevo León y en algunos Estado del Sur de E.A.U., colectada en 1986 en el Municipio General Terán, Nuevo León y mantenidas es nuestro laboratorio desde entonces.

T. mexicana Herrich-Schaeffer, 1848 (Fig. 4H): Distribuida en Hidalgo y Querétaro. Donada por el Dr. José Alejandro Martínez Ibarra en el año 2008, los pies de cría fueron colectados en Guanajuato.



A) *D. maximus*



B) *M. bassolsae*



C) *M. pallidipennis*



D) *M. phyllosomus*



E) *M. picturatus*



F) *T. infestans*



G) *T. lecticularia*



H) *T. mexicana*

Fig. 4 Adultos de las especies utilizadas (original de Autor)

De cada especie se usaron 60, especímenes en primer estadio y la misma cantidad para el tercer estadio (Fig. 5), haciéndose un primer experimento con 30 especímenes (Castro *et al.* 2004) de cada estadio, alimentándolos con sangre de carnero desfibrinada que contenía 5 000 tripomastigotes por ml. y repitiendo el estudio en una ocasión.

V.II CULTIVO DE TRIATOMINOS

Las colonias se han mantenido en forma semejante a lo propuesto por Ryckman en frascos de vidrio, de boca ancha, con tapa de rosca a la que se le hicieron orificios que permiten la ventilación (Ryckman 1951). La incubación se ha hecho a una temperatura de 28° Centígrados y una humedad relativa del 60 % al 70 % (Wood 1964).

V.III ALIMENTACIÓN

La alimentación de los transmisores se realizó de dos formas, en la primera se colocó sangre de carnero desfibrinada sobre un recipiente que es cubierto con una membrana de látex, la cual obtuvimos a partir de condones (Silva 1991; Franco *et al.* 2002), previamente lavada con agua, jabón y alcohol al 70 % para eliminar los lubricantes y espermaticida; posteriormente se calienta el recipiente, en baño maría a 37° C., se retiraba y se colocaba, con la membrana hacia abajo, dentro de un frasco cilíndrico de vidrio que contiene a los triatomos y un trozo de cartón doblado en forma de biombo que sirve de soporte al recipiente y a los triatomos (Fig.6C), colocando este conjunto en una estufa que se encuentra a 28° C. y permitiéndoles la libre alimentación durante una hora; a esta se le ha denominado alimentación artificial o xenodiagnóstico artificial, según sea el caso (Silva 1991; Franco *et al.* 2002). La segunda se ha hecho sobre conejos y ratones libres de infección.



A) Ninfa de primer estadio de *D. maximus*



B) Ninfa de tercer estadio de *D. maximus*.



C) Ninfa de primer estadio de *M. pallidipennis*. Las ninfas del género *Meccus* presentan tamaños muy similares



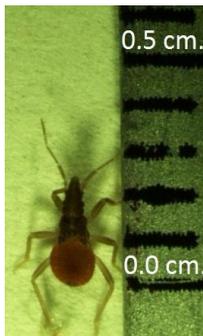
D) Ninfa de tercer estadio de *M. pallidipennis*. Las ninfas del género *Meccus* presentan tamaños muy similares



E) Ninfa de primer estadio de *T. infestans*



F) Ninfa de tercer estadio de *T. infestans*



G) Ninfa de primer estadio de *T. lecticularia* que presenta un tamaño similar al de *T. mexicana*



H) Ninfa de tercer estadio de *T. lecticularia* que presenta un tamaño similar al de *T. mexicana*

Fig. 5 Ninfas de primer y tercer estadio (Original del Autor)

En el caso de los triatomas que se infectaron en el primer estadio, la primera alimentación fue artificial y contiene a los parásitos (Fig.7), posteriormente se alimentaron cada 15 días para continuar con su desarrollo. En el caso de los transmisores que fueron infectados en el tercer estadio, se les alimentó de manera artificial cada 15 días hasta que llegaron a este estadio y en ese estadio se llevó a cabo la infección del mismo modo que se realizó en los triatomas de primer estadio, posteriormente fueron alimentados sobre conejo para su desarrollo (Fig. 6D). La sangre que se les brindó en el momento de la infección se pesó antes y después de la alimentación, con la finalidad de conocer el volumen ingerido y poder comparar esta cifra con la susceptibilidad entre especies.

V.IV OBTENCIÓN DE PARÁSITOS

Para obtener los parásitos se inocularon ratones con *T. cruzi* cepa NINOA, con heces de triatomas infectados, vía intraperitoneal. Se esperaron de 14 a 21 días para que se presentara la parasitemia, tras lo cual se hizo una punción cardiaca para obtener la sangre. Se hizo una cuenta en cámara de Neubauer y se hicieron las diluciones pertinentes para obtener 5 000 parásitos por mililitro, cantidad con la cual se inocularon a los triatomas, tanto de primer como de tercer estadio (Alejandre-Aguilar *et al.* 1993; Alejandre-Aguilar *et al.* 1996).

V.V INFECCIÓN Y REVISIÓN

Tanto en la infección de primer estadio como en la de tercer estadio, las revisiones se hicieron a los 30 días. Para llevar a cabo esta actividad se alimentó a los triatomas sobre conejo, posteriormente a través de compresión abdominal (Alejandre-Aguilar *et al.* 1993; Alejandre-Aguilar *et al.* 1996) se obtuvo contenido intestinal, y se examinaron 10 campos

de esta muestra a un aumento de 200X, con la finalidad de determinar la positividad y la densidad parasitaria, esta última fue evaluada con los siguientes rangos: a) menos de un parásito por campo (<1), b) de uno a diez por campo (1-10) y c) más de diez tripanosomas por campo (>10)

V.VI ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico empleado se dio en tres pasos, en una primera etapa se realizó un análisis de heterogeneidad ($\alpha=0.05$) de los dos experimentos. En la segunda etapa se hizo un análisis de χ^2 ($\alpha=0.05$) a través de una tabla de contingencia tridimensional considerando especie (8), infección (2) y estadio (2), posteriormente se realizaron las pruebas de independencia parcial por medio de tablas de contingencia bidimensionales. Para estas dos etapas se utilizó el programa Excel de la Paquetería de Office® 2007.

En la etapa final con los datos en términos de porcentaje de respuesta para el grupo de lectura “mayor a 10 parásitos por campo” como criterio de mayor susceptibilidad de infección, se efectuó una transformación arcosenica ($p' = \arcseno \sqrt[2]{p}$) que permite la aproximación a la normalidad. A continuación se efectuó un análisis de varianza bifactorial (especie, estadio) y se evaluó el efecto de la interacción mediante el modelo general lineal (SAS®, proc. GLM). Al obtener significancia se aplicaron las pruebas de comparación de media de “Ryan – Einot – Gabriel – Welsch” y de “Bonferroni” (Schlotzhauer y Littell 1987; Zar 2010). En todos los casos se aplicó un nivel de significancia $\alpha=0.05$. Para esta última etapa se utilizó el paquete estadístico SAS® versión 8.1.



Fig. 6: Alimentación de triatominos (original del autor).

A y B) Recipiente cubierto con membrana de látex para alimentación artificial. C) Lote de *M. bassolsae* alimentándose artificialmente. D) Alimentación sobre conejo y ratón.



Fig. 7: Xenodiagnóstico artificial

Lote de *D. maximus* alimentándose con sangre infectada con 5 000 parásitos / ml. de *T. cruzi* cepa NINOA (Original de autor)

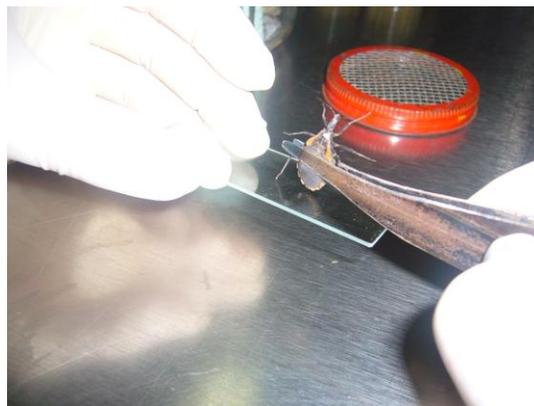


Fig. 8: Compresión abdominal

Ninfa de tercer estadio a la que se le comprime el abdomen para obtener contenido intestinal y hacer la revisión en microscopio (Original del autor).

VI.- RESULTADOS

En la tabla 1 se muestran los resultados del experimento A y B, que fueron realizados con cuatro meses de diferencia. Se obtuvieron cifras muy parecidas, que al no mostrar, en un análisis de heterogeneidad, diferencia estadísticamente significativa con un nivel de significancia $\alpha=0.05$, se examinaron los paquetes en conjunto.

Tabla 1.
Cantidad de triatomos positivos y negativos en los experimentos A y B.

Especie	Estadio	Experimento							
		A				B			
		Negativas	%	Positivas	%	Negativas	%	Positivas	%
<i>Dipetalogaster maxumus</i>	I	2	6.67%	28	93.33%	2	6.67%	28	93.33%
	III	3	10.00%	27	90.00%	3	10.00%	27	90.00%
<i>Meccus bassolsae</i>	I	0	0.00%	30	100.00%	0	0.00%	30	100.00%
	III	0	0.00%	30	100.00%	0	0.00%	30	100.00%
<i>Meccus pallidipennis</i>	I	1	3.33%	29	96.67%	0	0.00%	30	100.00%
	III	1	3.33%	29	96.67%	1	3.33%	29	96.67%
<i>Meccus phyllosomus</i>	I	4	13.33%	26	86.67%	6	20.00%	24	80.00%
	III	8	26.67%	22	73.33%	8	26.67%	22	73.33%
<i>Meccus picturatus</i>	I	4	13.33%	26	86.67%	1	3.33%	29	96.67%
	III	4	13.33%	26	86.67%	5	16.67%	25	83.33%
<i>Triatoma infestans</i>	I	9	30.00%	21	70.00%	8	26.67%	22	73.33%
	III	9	30.00%	21	70.00%	10	33.33%	20	66.67%
<i>Triatoma lecticularia</i>	I	8	26.67%	22	73.33%	8	26.67%	22	73.33%
	III	6	20.00%	24	80.00%	7	23.33%	23	76.67%
<i>Triatoma mexicana</i>	I	3	10.00%	27	90.00%	5	16.67%	25	83.33%
	III	2	6.67%	28	93.33%	5	16.67%	25	83.33%

Se emplearon 30 ejemplares de cada especie y en cada estadio, en cada experimento.
Repetición del experimento

En la tabla 2 se muestran los resultados del experimento A y B ya fusionados, de la capacidad de ocho especies de triatomos, en primero y tercer estadio para infectarse al realizar un xenodiagnóstico indirecto con un inóculo de 5 000 parásitos por mililitro de *T.*

cruzi cepa NINOA; en la tabla se observan las cantidades y los porcentajes de infección obtenidos. En el primer estadio, el porcentaje más alto lo obtuvieron *M. bassolsae*, *M. pallidipennis* y *D. maximus* con 100 %, 98.33 % y 93.33 % respectivamente, seguido de manera descendente por *M. picturatus* 91.97 %, *T. mexicana* 86.67 %, *M. phyllosomus* 83.33 %, *T. lecticularia* 73.33 % y el porcentaje más bajo lo encontramos en *T. infestans* 71.67 %. En el tercer estadio se obtuvieron resultados muy similares, con el porcentaje más alto se encuentran *M. bassolsae* (100 %), *M. pallidipennis* (96.67 %) y *D. maximus* (90 %), seguidas por *T. mexicana* (88.33 %), *M. picturatus* (85 %), *T. lecticularia* (78.33 %), *M. phyllosomus* (73.33 %) y por último, al igual que lo observado en el primer estadio, *T. infestans* (68.33 %).

Tabla 2
Cantidad y porcentaje de triatominos infectados y no infectados de cada especie y en cada estadio estudiado.

Especie	Estadio	Infección			
		Negativa	%	Positiva	%
<i>Dipetalogaster maximus</i>	I	4	6.67 %	56	93.33 %
	III	6	10.00 %	54	90.00 %
<i>Meccus bassolsae</i>	I	0	0.00 %	60	100.00 %
	III	0	0.00 %	60	100.00 %
<i>Meccus pallidipennis</i>	I	1	1.67 %	59	98.33 %
	III	2	3.33 %	58	96.67 %
<i>Meccus phyllosomus</i>	I	10	16.67 %	50	83.33 %
	III	16	26.67 %	44	73.33 %
<i>Meccus picturatus</i>	I	5	8.33 %	55	91.67 %
	III	9	15.00 %	51	85.00 %
<i>Triatoma infestans</i>	I	17	28.33 %	43	71.67 %
	III	19	31.67 %	41	68.33 %
<i>Triatoma lecticularia</i>	I	16	26.67 %	44	73.33 %
	III	13	21.67 %	47	78.33 %
<i>Triatoma mexicana</i>	I	8	13.33 %	52	86.67 %
	III	7	11.67 %	53	88.33 %

Se emplearon 60 ejemplares de cada especie y en cada estadio (30 de la primera muestra y 30 de la repetición).

De aquellas que resultaron positivas se midió la densidad parasitaria bajo tres parámetros: a) menos de un parásito por campo (<1), b) de uno a diez parásitos por capo (1-10) y c) más de 10 parásitos por campo (>10). Las densidades más altas las encontramos en *M. bassolsae*, *M. pallidipennis* y *T. mexicana*; y las más bajas son *M. phyllosomus*, *T. lecticularia* y *T. infestans*. En la figura 8 se muestran las densidades parasitarias encontradas en el primer estadio de cada especie.

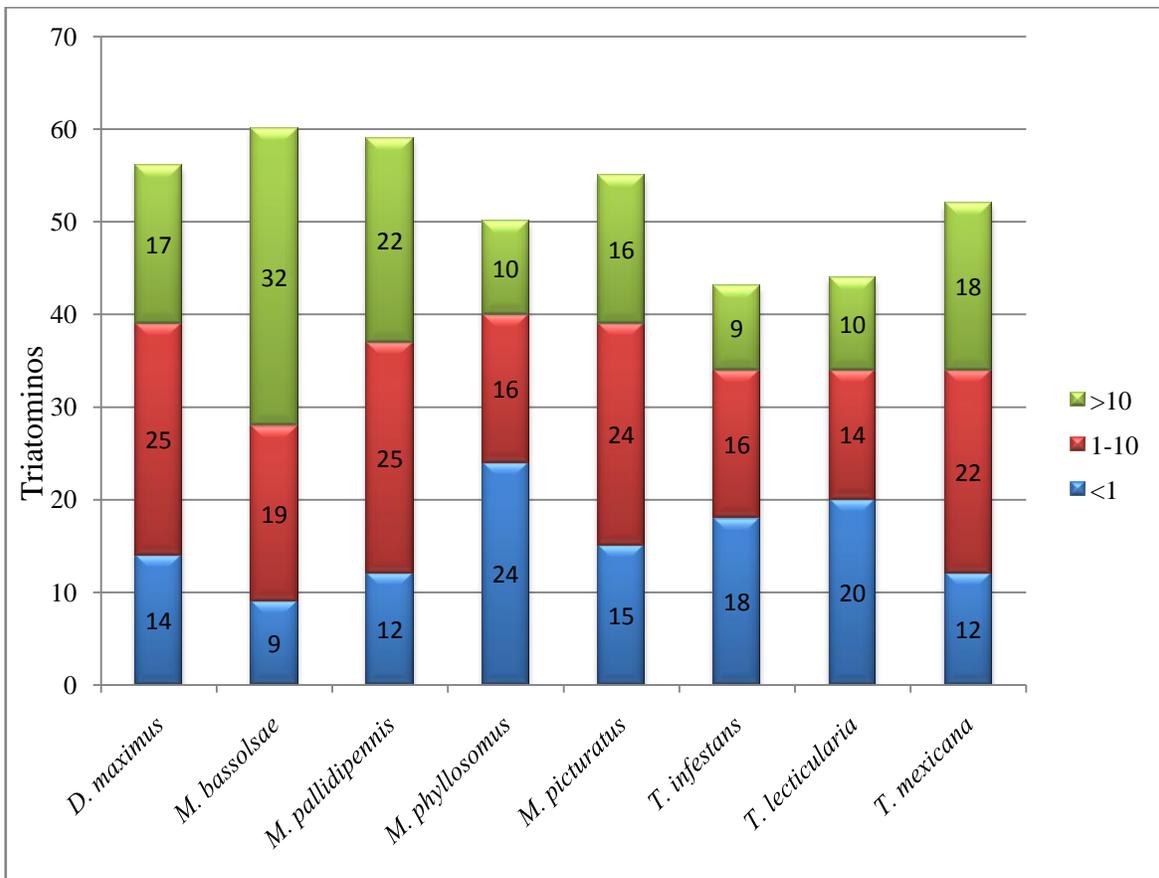


Fig. 9 Total de triatominos en primer estadio positivos y la densidad parasitaria por campo observada.

En la figura 9 se muestran las densidades parasitarias encontradas en los triatominos de tercer estadio. Las que presentaron una densidad parasitaria más alta fueron *M.*

bassolsae, *T. mexicana* y *D. maximus*; las que presentaron una densidad parasitaria más baja fueron *M. picturatus*, *M. phyllosomus* y *T. lecticularia*,

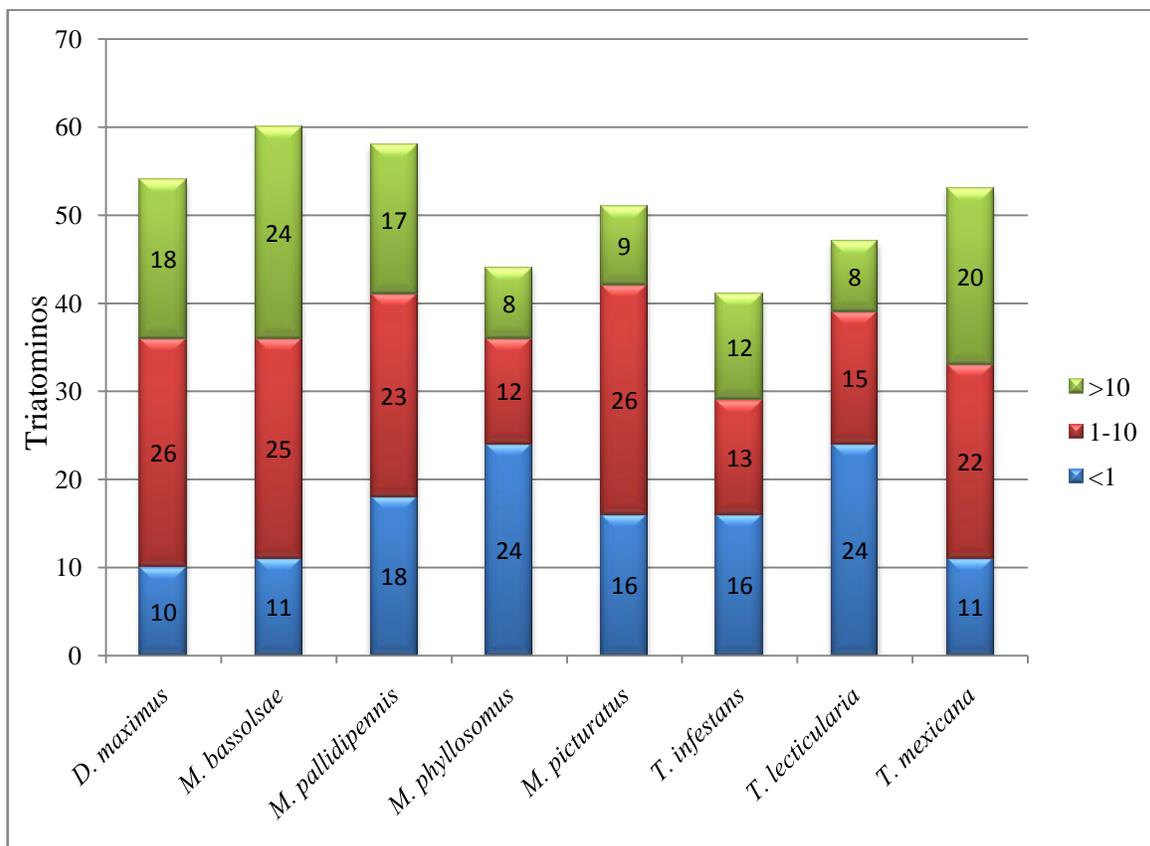


Fig.10: Total de triatominos en tercer estadio positivos y la densidad parasitaria por campo observada.

Se realizó un análisis de χ^2 de contingencia tridimensional en donde obtuvimos el rechazo de la hipótesis de independencia mutua, lo cual nos indicó que existía interdependencia entre especie, estadio, infección. Posteriormente se realizaron pruebas de χ^2 bidimensional para probar la independencia parcial entre infección vs especie e infección vs estadio, se rechazó la hipótesis de independencia, lo cual nos indicó que la infección era independiente del estadio pero no era independiente de la especie.

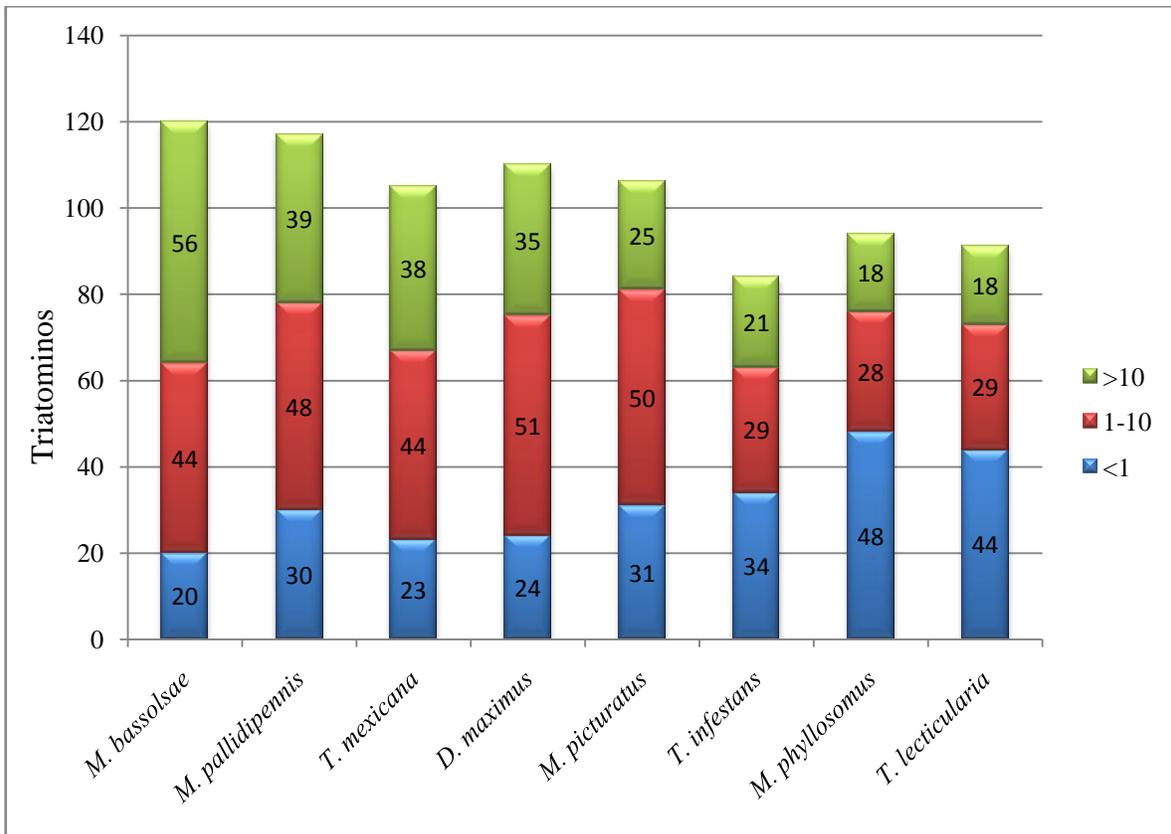


Fig. 11: Gráfica 3 Total de triatominos en primer y tercer estadio positivos y la densidad parasitaria por campo observada.

El análisis de varianza bifactorial (especie, estadio) indica que no existe deferencia estadísticamente significativa ($\alpha=0.05$) entre el primer y el tercer estadio, lo cual apunta que pueden realizarse xenodiagnósticos con triatominos en primer estadio lo cual se traduce en varias ventajas.

Dado que no existió diferencia entre los estadios se manejaron en conjunto los datos de susceptibilidad (grafica 3) y se tomó el grupo de observación de “más de 10 parásitos por campo” como el mayor rango de susceptibilidad, el análisis estadístico arrojó que existen seis niveles de significancia que se muestran en la figura 11.

Como se puede observar en la tabla anterior *M. bassolsae* forma un grupo, es la más susceptible y presenta algunas características que le confieren ventajas para este tipo de estudio. En un segundo grupo se encuentran *M. pallidipennis* y *T. mexicana*. En un tercer escalón se encuentra *D. maximus*, seguido por *M. picturatus*. En el penúltimo nivel se

encuentra *T. infestans* y *T. lecticularia*, quedando al final *M. phyllosomus*. (*M. bassolsae* > *M. pallidipennis* = *T. mexicana* > *D. maximus* > *M. picturatus* > *T. infestans* = *T. lecticularia* > *M. phyllosomus*). Esto se aprecia en la gráfica 4.

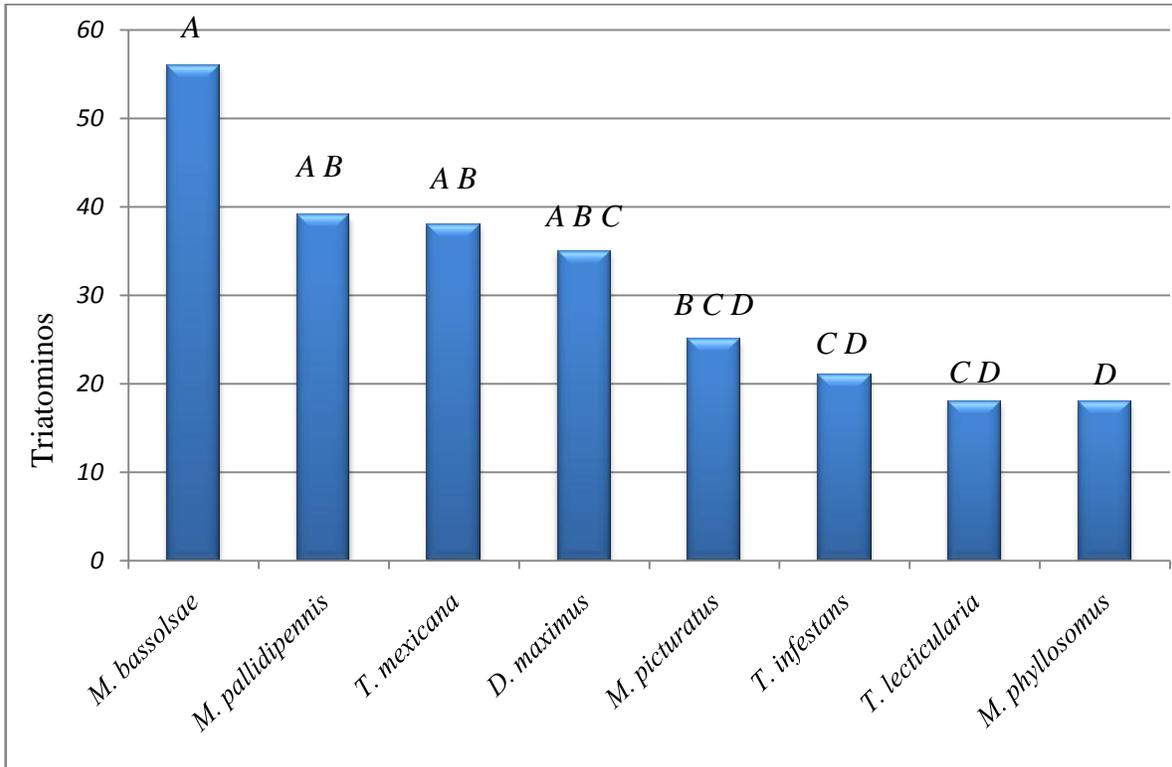


Fig. 12: Gráfica 4. Densidad parasitaria de más de diez parásitos por campo y grupo de significancia estadístico.

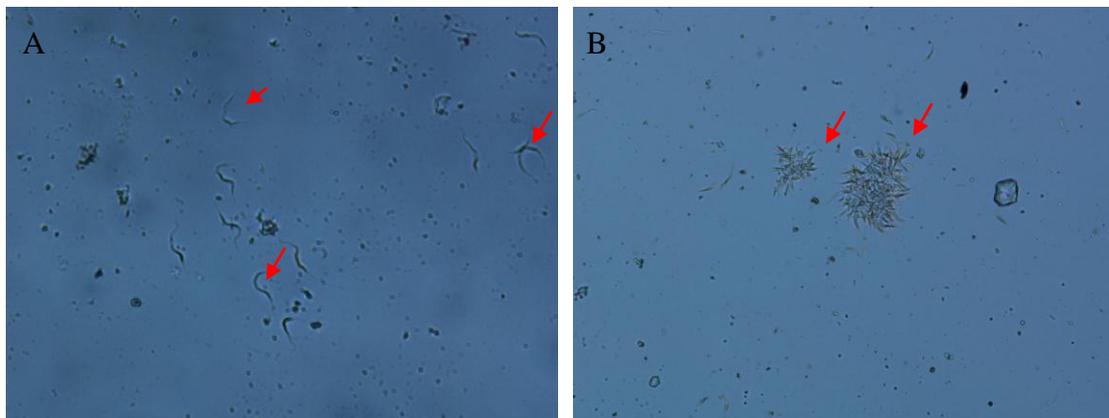


Fig. 13: Deyecciones con parásitos. A) Tripomastigotes metacíclicos. B) Racimos de epimastigotes.

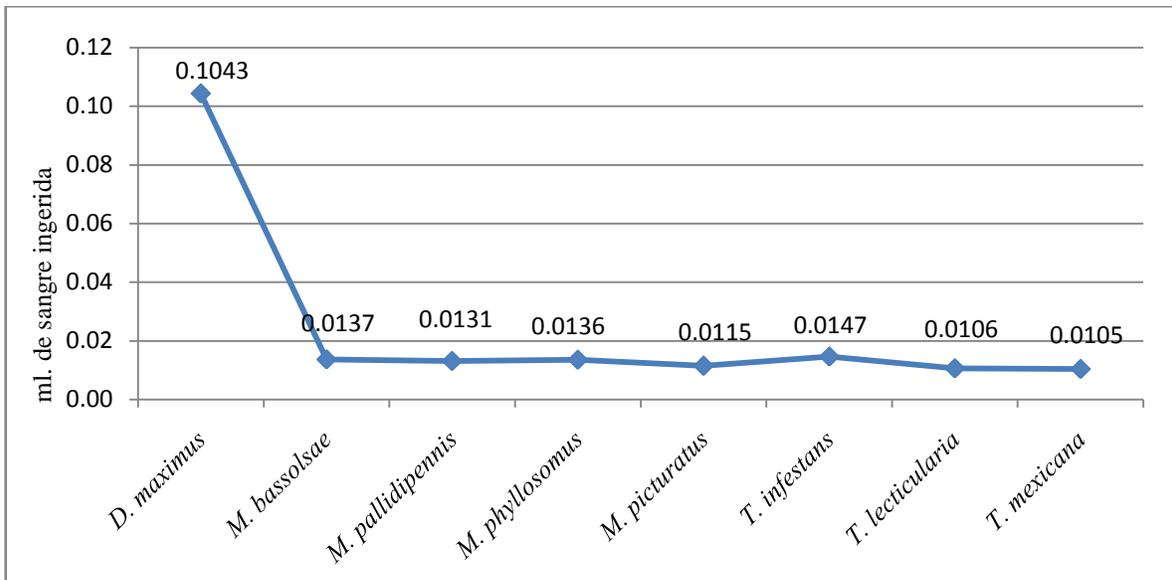


Fig. 14: Gráfica 5. Cantidad en mililitros que ingiere un individuo en primer estadio de cada especie.

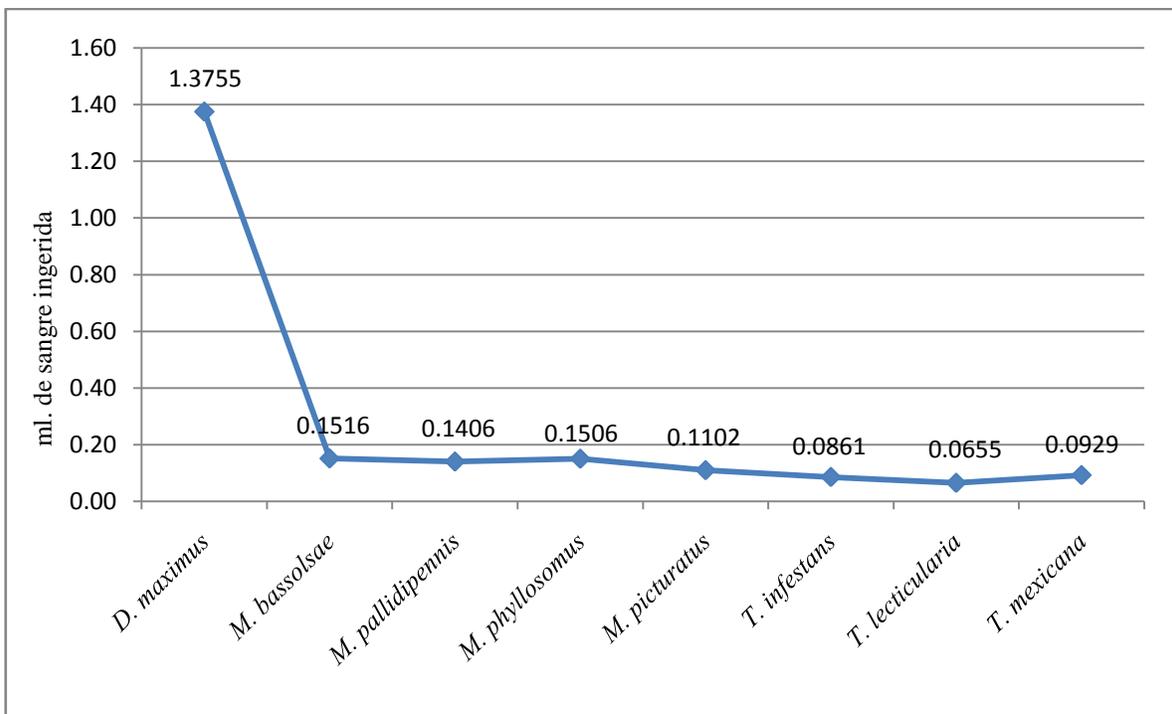


Fig. 15: Gráfica 6. Cantidad en mililitros que ingiere un individuo en tercer estadio de cada especie.

VII.- DISCUSIÓN

Los triatominos fueron conservados a 28° C. y entre 70 % de humedad relativa, en frascos de vidrio de boca ancha y tapas perforadas para permitir la ventilación, de este modo obtuvimos el material que se requería para este estudio y se coincide con lo reportado en la literatura como condiciones optimas para el mantenimiento de las colonias de triatominos (Ryckman 1951; Wood 1964; Perlowagora-Szumlewicz y Müller 1982)

Debido a las controversias encontradas en relación a la susceptibilidad de las distintas especies de triatominos fue que decidimos realizar este estudio con especies que no han sido estudiadas, y algunas otras que se han estudiado y sirvieron de referencia para este estudio. Además de evaluar la utilidad del primer estadio, situación que sólo había sido estudiada en *D. maximus*, *Panstrongylus megistus*, *T. infestans* y *R. prolixus*. La primera especie si ha sido puesta a prueba durante la fase crónica de la enfermedad, pero las otras tres solo se probaron en la fase crónica con buenos resultados aunque con resultados heterogéneos ya que las condiciones de experimentación, como el empleo de distintos números de triatominos, en animales e individuos con distintas parasitemias, en diferentes fases de la infección o la enfermedad no eran uniformes, situación que en este estudio sí se dieron. (Miles *et al.* 1975; Minter *et al.* 1977; Cuba *et al.* 1978; Cuba *et al.* 1979; Marsden *et al.* 1979). Coincidimos en que el primer estadio puede ser utilizado para el xenodiagnóstico pero era necesario realizar el estudio con especies mexicanas en este estadio, ya que no se había hecho e infectar a las distintas especies con la misma cantidad de parásitos para poder estandarizar la técnica, situación que solo se ha publicado en una ocasión (Alejandre-Aguilar *et al.* 1993).

En este estudio se tomaron las siguientes precauciones con el propósito de reducir las variables que pudieran modificar la susceptibilidad a la infección de las distintas especies y estadios de triatominos:

- a) Sólo se utilizaron ninfas de primer y tercer estadio de edades similares en cada estudio.
- b) Todos los insectos que se emplearon en tercer estadio fueron alimentados, hasta el momento de la inoculación con sangre de carnero desfibrinada.
- c) Todos los insectos fueron inoculados en igualdad de condiciones con 5 000 parásitos por mililitro de sangre que también era de carnero y desfibrinada.
- d) Sólo se emplearon los ejemplares que alcanzaban la repleción al momento de la inoculación.

El periodo para llevar a cabo la revisión de las heces fue de treinta días, ya que éste ha sido considerado como el tiempo óptimo (Marsden *et al.* 1969; Schenone *et al.* 1969). En un estudio se reportó que posterior a este tiempo la cantidad de individuos positivos tienden a disminuir, así como las densidades parasitarias (Perlowagora-Szumlewicz y Müller 1982)

Observamos que los triatominos en primer estadio no presentan, aparentemente, diferencias estadísticamente significativas en relación a los de tercer estadio, por tal motivo el xenodiagnóstico se puede efectuar con ninfas de primer estadio, lo cual confiere tres grandes ventajas: a) una ingestión menor de sangre lo que representa una menor pérdida de

sangre que nos permite seguir trabajando con mamíferos pequeños, b) la obtención de los insectos para realizar el xenodiagnóstico resulta más sencilla y la cantidad de recursos empleados disminuye (Minter *et al.* 1977), y c) en caso de ser un xenodiagnóstico directo en humanos, las molestias y las reacciones alérgicas serán mucho menores (Mott *et al.* 1980; Klotz *et al.* 2010).

En algunos estudios se habla de una relación directa entre la cantidad de sangre ingerida y la susceptibilidad de los triatominos (Cerisola *et al.* 1971; Barreto *et al.* 1978; Alejandre-Aguilar *et al.* 1993; Alejandre-Aguilar *et al.* 1996), esta situación no se observó en este estudio. En el género *Meccus* existió una mínima diferencia en la cantidad de sangre ingerida pero la susceptibilidad es muy variable, lo mismo ocurre con el género *Triatoma*, la diferencia en volumen ingerido entre *T. mexicana* y *T. lecticularia* es muy poca, pero la diferencia de susceptibilidad es importante. En el caso de *D. maximus* cuyo volumen de ingestión es considerablemente superior a cualquier otra especie, no resulto ser la más susceptible (Gráficas 5 y 6).

Otro factor de gran importancia es la densidad parasitaria, una mayor densidad nos hará suponer una mayor susceptibilidad. Esta situación se puede apreciar muy bien en la gráfica 3, en donde se nota una similitud de individuos infectados entre *D. maximus* y *M. picturatus*, pero existe una diferencia entre los individuos que presentan una densidad parasitaria mayor a 10, siendo preferible el uso de la primera especie sobre la segunda (tabla 3).

Resulta evidente que si existe una diferencia entre las especies estudiadas, en algunos casos esas diferencias no son significativas, pero aquí entran en juego otros

factores como la agresividad que presenta cada especie, la facilidad de manejo y la densidad parasitaria que presentan.

El género *Meccus* presenta tres características importantes para estudios como este: a) es muy agresiva: al utilizarla en primer estadio el tiempo aproximado de alimentación hasta su repleción es de 15 minutos, b) su reproducción en condiciones de laboratorio es muy eficiente y c) se adaptan muy bien a la alimentación artificial, ya que comparadas con otras especies como *T. nahuatle* y *T. rubida* que no fueron utilizadas en este estudio por la dificultad que presentaron para alimentarse de forma artificial. La desventaja de *D. maximus* es que por su tamaño ingiere grandes dimensiones de sangre lo que se traduce en más recursos para su mantenimiento. El género *Triatoma* tiene como inconvenientes su menor agresividad para alimentarse en comparación con los géneros *Meccus* y *Dipetalogaster*, una mayor dificultad para atravesar la membrana, sobre todo en primer estadio. Todas las especies utilizadas en este estudio se adaptan y se reproducen eficientemente bajo las condiciones de laboratorio.

Una ventaja que encontramos en *M. bassolsae* es que posee un exoesqueleto más resistente que el resto de las especies, lo cual nos permite la revisión por compresión abdominal sin que sufra daños apreciables.

En la especie *T. mexicana* que presentó una alta susceptibilidad encontramos como desventaja que tiene un tamaño pequeño (Fig. 8) y un ciclo de vida más largo que el resto de las especies encontradas.

Las especies que han presentado los porcentajes de individuos positivos más bajos son *T. infestans*, *M. phyllosomus* y *T. lecticularia*. Otras desventajas que presenta *T. lecticularia* es que son pequeñas y son frágiles, por lo cual resulta difícil su compresión abdominal sin lastimarlas.

El método de revisión de los triatominos utilizados en el xenodiagnóstico es otro factor a considerar. Se ha empleado la defecación espontánea, la compresión abdominal, la punción rectal, la disección del intestino de cada triatomo y la licuefacción del lote completo de triatominos. La defecación espontánea consiste en revisar un concentrado de heces de un conjunto de triatominos empleados en un xenodiagnóstico, teniendo como desventaja un mayor volumen de heces y menor densidad parasitaria, lo cual complica la detección de los flagelados; por otro lado impide calificar y cuantificar a los triatominos infectados. La gran ventaja que se presenta es que no son dañados los triatominos. La compresión abdominal si permite la calificación y la cuantificación de los triatominos infectados, y los daños que se presentan en los triatominos son mínimos, una vez que el personal es capacitado; otra ventaja que presenta esta técnica es que los triatominos que resulten negativos en una primera revisión, pueden ser estudiados en eventos posteriores. La punción rectal tiene como desventaja que se requiere de un buen entrenamiento, ya que existe el riesgo de lesionar a los triatominos y ofrece casi las mismas ventajas de la compresión abdominal. Por otro lado la disección individual, que también permite determinar de forma individual la infección, tiene como gran inconveniente el sacrificio del ejemplar, lo que impide su revisión posterior en caso de resultar negativo. Por último la técnica de Meckelt (1964), cuya enorme ventaja es el ahorro de tiempo, ya que la revisión de un grupo de chinches, sin importar el número, empleadas para un xenodiagnóstico se

puede hacer en 20 minutos, pero tiene como limitante la confusión de *T. cruzi* con *Trypanosoma rangeli*, por personal inexperto, ya que las formas metacíclicas de este último protozooario se encuentran en las glándulas salivales, y como desventaja el sacrificio de los triatomíneos, además de aumentar el riesgo de infección accidental del personal de laboratorio (Dias 1940; Rohwedder *et al.* 1970; Marsden *et al.* 1979; Cedillos *et al.* 1982). En este estudio la técnica empleada fue la compresión abdominal por ser la más confiable y reproducible, pues es fácil entrenar al personal de laboratorio que la llevará a cabo.

VIII.- CONCLUSIONES

1. Existen diferencias interespecíficas en la susceptibilidad a la infección con *T. cruzi*.
2. No existe diferencia significativa en la susceptibilidad a la infección con *T. cruzi* entre ninfas de primer y tercer estadio.
3. Se propone el siguiente orden de susceptibilidad en las especies utilizadas:
 $M. bassolsae > M. pallidipennis = T. mexicana > D. maximus > M. picturatus = T. infestans > M. phyllosomus.$
4. Proponemos a *M. bassolsae* como la especie ideal para llevar a cabo este tipo de trabajos. En caso de no contar con ella *M. pallidipennis* también representa una excelente opción y como tercera opción proponemos a *D. maximus*.

IX .- SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS

Consideramos conveniente probar la susceptibilidad de otras especies de triatominos a la infección con *T. cruzi*, teniendo en cuenta la facilidad de manejo, la agresividad y su adaptación a condiciones de laboratorio. También recomendamos el estudio de la susceptibilidad con otras cepas de *T. cruzi* tanto mexicanas como de otros países.

Resulta conveniente estudiar los factores que participan en la susceptibilidad de los triatominos a la infección con *T. cruzi* y el tipo de simbiosis que se presenta.

X.- BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Alejandre-Aguilar, R., Noguera-Torres, B., Calvo-Mendez, M. L. y Cortés-Jimenez, M. 1993. Estudio Comparativo de la Susceptibilidad de Cinco Especies de Triatominos (Insecta: Reduviidae) a la Infección con *Trypanosoma cruzi*. Rev. Lat.-Amer. Microbiol. 35: 201-206.
- 2.- Alejandre-Aguilar, R., Noguera-Torres, B., Isita-Tornell, L. y Mazariego -Arana, M. A. 1996. Susceptibilidad de Cinco Especies de Triatominos (Hemiptera: Reduviidae) en el Xenodiagnóstico Natural y Artificial de la Enfermedad de Chagas. An. Esc. Nac. Cien. Biol. 42: 75-83.
- 3.- Andrade, S. G. y Andrade, Z. 1966. Chagas' Disease and Neuronal Alterations at the Auerbach Plexus. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 8: 219-224.
- 4.- Apt, W., Arribada, A., Zulantay, I., Solari, A., Sánchez, G., Mundaca, K., Coronado, X., Rodríguez, J., Gil, L. C. y Osuna, A. 2005. Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American trypanosomiasis: the results of clinical and parasitological examinations 11 years post-treatment. Ann. of Trop. Med. and Parasitol. 99(8): 733-741.
- 5.- Atias, A. 1998. Parasitología Médica. Santiago, Chile, Manual Moderno - Mediterraneo. 251-263
- 6.- Barreto, A. C., Marsden, P. D., Cuba, C. C. y Alvarenga, N. J. 1978. Preliminary Study on the Use of *Dipetalogaster maximus* (Uhler, 1984) (triatominae) in the Xenodiagnostic Technic in the Chronic Form of Chagas' Disease. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 20(4): 183-189.
- 7.- Botero, D. y Restrepo, M. 2003. Parasitosis Humanas. Medellín, Colombia, Corporación para Investigaciones Biológicas. 210-230
- 8.- Brener, Z. 1987. Pathogenesis and Immunopathology of Chronic Chagas disease. In meeting on Immunopathology and pathogenesis of Chagas' disease, Leishmaniasis and Leprosy. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 82(Suppl. 1): 205-213.
- 9.- Britto, C. C. 2009. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 104: 122-135.
- 10.- Bumpt, E. O. 1914. O xenodiagnóstico. Aplicação do diagnóstico de algumas infecções parasitárias em particular trypanosomose de Chagas. An. Paul. Med. Cirurg. 3(5): 97-117.
- 11.- Carrada-Bravo, T. 2004. *Trypanosoma cruzi*: Historia natural y diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Rev. Mex. Patol. Clin. 51(4): 205-219.

- 12.- Castro, C., Santos, M. C. A. y Silveira, C. A. 2004. Estudio comparativo entre o xenodiagnóstico artificial realizado imediatamente e quatro horas após a coleta de sangue. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 37(2): 128-130.
- 13.- CDC. 2009, 07 20 09. "Center for Disease Control and Prevention." Revisado 06 11 09, de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm>.
- 14.- Cedillos, R. A., Hubsc, R., Tonn, R. J., Escalante, P. M., Carrasquero, B. y Liendo, H. 1982. Comparación de Dos Métodos de Laboratorio para Examinar Xenodiagnósticos. Bol. Of. Sanit. Panam. 73(6): 576-581.
- 15.- Cedillos, R. A., Torrealba, J. W., Tonn, R. J., Mosca, W. y Ortegón, A. 1982. El Xenodiagnóstico Artificial en la Enfermedad de Chagas. Bol. Of. Sanit. Panam. 93(3): 240-249.
- 16.- Cerisola, J. A., Rohwedder, R. W. y del Prado, C. E. 1971. Rendimiento del Xenodiagnóstico en la Infección Chagásica Crónica Humana Utilizando Ninfas de Diferentes Especies de Triatominos. Bol. Chil. Parasit. 26(1): 57-58.
- 17.- Coura, J. R. 2007. Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. . Mem. Inst. Oswaldo Cruz 102(Suppl 1): 113-122.
- 18.- Coura, J. R. y De Castro, S. L. 2002. A critical review on Chagas' disease chemotherapy. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 92(1): 3-24.
- 19.- Cuba, C. C., Alvarenga, N. J., Barreto, A. C., Marsden, P. D., Macedo, V. y Gama, M. P. 1979. *Dipetalogaster maximus* (Hemiptera, Triatominae) for xenodiagnosis of patients with serologically detectable *Trypanosoma cruzi* infection. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 73(5): 524-527.
- 20.- Cuba, C. C., Alvarenga, N. J., Barretto, C., Marsden, P. D. y Chiarini, C. 1978. Nuevos Estudios Comparativos entre *Dipetalogaster maximus* y *riatoma infestans* en el Xenodiagnóstico de la Infección Chagásica Crónica Humana. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 20(3): 145-151.
- 21.- Chagas, C. 1909. Nova tripanozomaise humana. Estudio sobre a morfologjiae o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.gen., n.sp., agente etiolojico de nova entidade mórbida do homen. Mem. Inst. Oswaldo Cruz.(1): 159.
- 22.- Chester-Beaver, P., Clifton-Jung, R. y Wayne-Cupp, E. 2003. Parasitología Clínica de Craig Faust. México, D.F., Masson Doyma. 93-102
- 23.- Dias, E. 1940. Técnica do Xenodiagnóstico na Molestia de Chagas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 35: 335-342.
- 24.- Ferreira, A. W., Belem, Z. R., Lemos, E. A., Reed, S. G. y Campos-Nieto, A. 2001. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Serological Diagnosis of Chagas' Disease

Employing a *Trypanosoma cruzi* Recombinant Antigen That Consists of Four Different Peptides. J. Clin. Microbiol. 39(12): 4390–4395.

25.- Fistein, B. y Chowdhury, M. N. 1980. *Trypanosoma cruzi*. A Suggested Adjunct to Xenodiagnosis. Ann. Trop. Med. Parasitol. 74(2): 251-253.

26.- Flisser, A. y Perez-Tamayo, R. 2006. Aprendizaje de la Parasitología Basado en Problemas. México, D.F., Editores de Texto Mexicanos. 411-428

27.- Franco, Y. B. A., Silva, I. G. d., Rassi, A., Rocha, A. C. R. G., Silva, H. H. G. d. y Rassi, G. G. 2002. Correlação entre a positividade do xenodiagnóstico artificial e a quantidade de sangue e triatomíneos utilizados no exame, em pacientes chagásicos crônicos. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 35(1): 29-33.

28.- Francolino, S. S., Fernandez, A. A., Talice, R., Rosa, R., Selanikio, J., Marcondes-de-Rezende, J., Romanha, Á. J. y Pinto-Dias, J. C. 2003. New Evidence of Spontaneous Cure in Human Chagas' Disease. Rev. Soc. Bras. Med. Trop 36(1): 103 - 107.

29.- Freitas, P. d. J. L. 1961. Diagnóstico de Laboratório da Moléstia de Chagas. Bol. Of. Sanit. Panam. 51(5): 429-438.

30.- Galvão, C., Caraballo, R., Da Silva, R. D. y Jurberg, A. 2003. Checking List of the Current Valid Species of the Subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their Geographical Distribution, with Nomenclatural and Taxonomic Notes. Zootaxa 202: 1 - 36.

31.- Garcia, E. S., Genta, F. A., Azambuja, P. d. y Schaub, G. A. 2010. Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. Trends Parasitol. 26(10): 499-505.

32.- Harwood, R. F. y James, M. T. 1993. Entomología Médica y Veterinaria. México, D.F. 139-152

33.- Junqueira, A. C. J., Figueiredo, A. R. y Coura, J. R. 1989. Sensitivity of Xenodiagnosis with *P. megistus* and *T. infestans* in Chronic Chagas' Disease, Preliminar Study Mem. Inst. Oswaldo Cruz 84(Suppl. II): 115.

34.- Kirchhoff, L. V. 1993. American Trypanosomiasis (Chagas' Disease) -- A Tropical Disease Now in the United States. N. Engl. J. Med. 329: 639-644.

35.- Klotz, J. H., Dorn, P. L., Logan, J. L., Stevens, L., Pinna, J. L., Schmidt, J. O. y Klotz, S. A. 2010. "Kissing bugs": Potential disease vectors and cause of anaphylaxis. Clinical Infectious Diseases 50(12): 1629-1634.

36.- Kollien, A. H. y Schaub, G. A. 2000. The Development of *Trypanosoma cruzi* in Tritominae. Parasitol. Today 16(9): 381-387.

- 37.- Lent, H. y Wygodzinsky, P. 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera:Reduviidae) and their Significance as Vector of Chagas' Disease. Bull. Am. Museum. Natural. His. 163: 142 - 520.
- 38.- Little, J. W., Tay, J. y Biagi, F. 1966. A Study on the Susceptibility of Triatomid Bugs to some Mexican Strains of *Trypanosoma cruzi*. J. Med. Ent 3(3): 252-255.
- 39.- López-Antuñano, F. J., Rangel-Flores, H. y Ramos, C. 2000. Diagnosis of Chagas' Disease. Rev. Lat.-Amer. Microbiol. 42(3): 121-129.
- 40.- Marsden, P. D., Barreto, A. C., Cuba, C. C., Gama, M. B. y Ackers, J. 1979. Improvements in Routine Xenodiagnosis with First Instar *Dipetalogaster Maximus* (Uhler 1894) (Triatominae). Am. J. Trop. Med. Hyg. 28(4): 649-652.
- 41.- Marsden, P. D., Prata, A., Sarno, P., Sherlock, I. A. y Mott, K. 1969. Some observations on xenodiagnosis with *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* in human infections with Bahian strains of *Trypanosoma cruzi*. . Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.: 425-426.
- 42.- Meckelt, G. A. 1964. A Modified Procedure of Xenodiagnosis for Chagas Disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 13: 11-15.
- 43.- Miles, M. A., Patterson, J. W., Marsden, P. D. y Minter, D. M. 1975. A comparison of *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* in the xenodiagnosis of a chronic *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* infection in a rhesus monkey (*Macaca mullatta*). Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 69(4): 377-382.
- 44.- Minter-Goedbloed, E. y Minter, D. M. 1987. Value of first-instar triatomines (Hemiptera; Reduviidae) in comparative xenodiagnosis of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi*. Parasitol. Res. 73: 565-567.
- 45.- Minter, D. M., Minter-Goedbloed, E. y Marshall, T. F. 1978. Comparative xenodiagnosis with tree triatomine species to different host with natural and experimental chronic infections with *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 71(6): 217-225.
- 46.- Minter, D. M., Minter-Goedbloed, E. y Vela, C. F. 1977. Quantitative Studies with First-instar Triatomines in the Xenodiagnosis of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* in Experimentally and Naturally Infected Host. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 71(6): 530-541.
- 47.- Minter, D. M., Minter-Goedbloed, E. y Vela, C. F. 1977. Quantitative studies with first-instar triatomines in the xenodiagnosis of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* in experimentally and naturally infected hosts. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 71(6): 530-541.

- 48.- Mott, K. E., França, J. T., Barret, T. B., Hoff, R., Oliveira, T. S. y Sher. 1980. Cutaneous allergic reactions to *Triatoma infestans* after xenodiagnosis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 75(3-4): 3-10.
- 49.- Neal, R. A. y Miles, R. A. 1977. The Number of Trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*, Required to Infect *Rhodnius prolixus*. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 19(3): 177-181.
- 50.- Nogueira-Torres, B., Alexandre-Aguilar, R., Isita-Tornell, L. y Camacho, A. 2000. Defaecation Pattern in Seven Species of Triatomines (Insecta, Reduviidae) Present in México. Rev. Lat.-Amer. Microbiol. 42(4): 145-148.
- 51.- O.P.S. 1984. Situación de la Enfermedad de Chagas en las Américas. Bol. Of. Sanit. Panam. 97: 159-165.
- 52.- Pereira, M. E., Andrade, A. F. y Ribeira, J. M. 1981. Lectins of Distinct Specificity in *Rhodnius prolixus* Interact Selectively with *Trypanosoma cruzi*. Science 211(6): 597-599.
- 53.- Pereira, V. L., Levy, A. M. A. y Boainain, E. 1989. Xenodiagnóstico; Hemocultura e Teste de Lise Mediada pelo Complemento, como Criterios de Seleção de Pacientes Chagásicos Crônicos para Quimioterapia. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 31(5): 301-307.
- 54.- Perlowagora-Szumlewicz, A. y Müller, C. A. 1982. Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of host with Chagas' disease 1- Comparative xenodiagnosis with nine triatomine species of animal with acute infections by *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 77(1): 37-53.
- 55.- Perlowagora-Szumlewicz, A. y Müller, C. A. 1987. Studies in Search of a Suitable Experimental Insect Model for Xenodiagnosis of Host with Chagas' Disease 2-Attempts to Upgrade the Reliability and the Efficacy of Xenodiagnosis in Chronic Chagas' Disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 82(2): 259-277.
- 56.- Phillips, N. R. y Bertram, D. S. 1967. Laboratory Studies of *Trypanosoma cruzi* Infections. In *R. prolixus*, *T. infestans*, *T. prorracta* y *T. maculata*. J. Med. Ent 4(2): 168-174.
- 57.- Pifano, F. C. 1954. El Diagnóstico Parasitológico de la Enfermedad de Chagas en Fase Crónica. Archiv. Venezol. Patol. Trop. 11(2): 121-156.
- 58.- Pinto, A. Y. d. N., Ferreira, A. G., Valente, V. d. C., Harada, G. S. y Valente, S. A. d. S. 2009. Urban outbreak of acute Chagas disease in Amazon region of Brazil: four-year follow-up after treatment with benznidazole. Pan Amer. J. Pub. Health 25: 77-83.
- 59.- Rebololán, J. B. 1969. Sensibilidad de los métodos de diagnóstico parasitológico en pacientes con enfermedad de Chagas aguda tratados con Bay 2502. Bol. Chil. Parasitol. 24: 49-50.

- 60.- Rocha, D. S., Galvao, C. y Jurberg, J. 2001. Hallazgos de *Triatoma infestans* en México. Rev. Biol. Trop, 49(3-4): 1284-1284.
- 61.- Rohwedder, R. W., del, P. C. E., Cerisola, J. A. y Rebosolan, J. B. 1970. Aportes al Método del Examen del Xenodiagnóstico Previo Licuado de los Triatominos. Bol. Chil. Parasitol. 25: 106-110.
- 62.- Ryckman, E. R. 1951. Laboratory cultura of triatominae with observations on behavior and new feeding device. J. Parasitol. Sep: 210-214.
- 63.- Salgado, A. d. A. 1969. Metodología y Sensibilidad del xenodiagnóstico. Bol. Chil. Parasit. 24(1): 9-13.
- 64.- Schenone, H. 1999. Xenodiagnosis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 94(Suppl 1): 289-284.
- 65.- Schenone, H., Alfaro, H. y Reyes, H. 1969. Therapeutic Experiences with Bay 2502 in Chronic Chagas' Disease in Adults. Importance of the Correct use for Xenodiagnosis. Bol. Chil. Parasit. 24(1): 66-69.
- 66.- Schenone, H., Alfaro, H., Reyes, H. y Taucher, E. 1968. Valor del Xenodiagnóstico en la Infección Chagásica Crónica. Bol. Chil. Parasitol. 23: 149-154.
- 67.- Schenone, H., Alfaro, H. y Rojas, A. 1969. Rendimiento del Xenodiagnóstico en las Formas Aguda y Congénita de la Enfermedad de Chagas. Bol. Chile. Parasitol. 24(1): 105-106.
- 68.- Schenone, H., Alfaro, H. y Rojas, A. 1974. Basis and Yield of the Xenodiagnosis in Aacute and Congenital Chagas' Disease. Bol. Chil. Parasit. 29(1-2): 24-26.
- 69.- Schlotzhauer, S. D. y Littell, R. C. 1987. SAS[®] System for Elementary Statistical Analysis, SAS Institute Inc.
- 70.- Segura, E. L. 1987. Xenodiagnosis, Captiulo 3. Chagas' Disease Vectors. Anatomic and Physiological Aspects. Brenner, R. R. Boca Raton Florida, CRC Press, Inc. II: 41-46.
- 71.- Silva, I. G. d. 1991. Dispositivo para relizaçãodo xenodiagnóstico artificial. Rev. Patol. Trop. 20(1): 35-38.
- 72.- Urdaneta-Morales, S. 1973. *Trypanosoma cruzi* Infections in *Rhodnius prolixus* Refed on Diferent Hosts. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 15(4): 218-221.
- 73.- W.H.O. 1990. Chagas Disease. Wkly. Epidem. Rec. 65: 257.
- 74.- Wood, S. F. 1964. The Laboratory Culture of *Triatoma* (Hemiptera, Reduviidae). Bull. Wld. Hlth. Org. 31: 579-581.
- 75.- Zar, J. H. 2010. Biostatistical Analysis, Pearson.

76.- Zárate, G. L., Morales, L. G., Cabrera, O. M., García, S. G. y Zárate, J. R. 1984. The biology and behavior of *Triatoma barberi* (Hemiptera:Reduviidae) in México. IV. Feeding and defecation patterns. *J. Med. Entomol.* 21: 548-560.

77.- Zeledón, R., Alvarado, R. y F., J. L. 1977. Observations of feeding and defaecation of three Triatominae species (Hemiptera:Reduviidae). *Acta Tropica* 34: 65-77.