

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades

TRANSMISION EXPERIMENTAL DE LEISHMANIA
MEXICANA MEXICANA POR TRES ESPECIES DE
FLEBOTOMOS, CON OBSERVACIONES SOBRE EL
DESARROLLO DEL PARASITO EN LOS
TRES VECTORES POTENCIALES

MARIA CELIA CORDON CHANG

Guatemala

1987

BIBLIOTECA
DE LA
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

TRANSMISION EXPERIMENTAL DE LEISHMANIA
MEXICANA MEXICANA POR TRES ESPECIES DE
FLEBOTOMOS, CON OBSERVACIONES SOBRE EL
DESARROLLO DEL PARASITO EN LOS
TRES VECTORES POTENCIALES

Vo. Bo.:

(f) R F Beach

Doctor Raymond F. Beach

Tribunal:

(f) T Navin

Doctor Thomas Navin

(f) m s

Doctora Margaret Dix

Fecha de aprobación:

Guatemala, 6 de marzo de 1987.

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a todas las personas que me brindaron su ayuda profesional y técnica, en la realización de este trabajo:

Al doctor Trenton K. Ruebush II por su acertada orientación y entusiasmo en el desarrollo del trabajo.

Al doctor Charles H. Porter por el tiempo que dedicó al asesorar el diseño y el desarrollo del trabajo experimental de la investigación.

A la doctora Margaret Dix por su valiosa colaboración.

A el doctor Raymond F. Beach por su incondicional apoyo y consejos durante la fase final del trabajo.

Al doctor Ricardo Luján por la revisión final del manuscrito.

Al personal del Departamento de Entomología Médica de la Universidad del Valle de Guatemala, en especial a María Laura Hall, Esperanza Muy González, Eduviges Molina, Juan Alberto García y Hugo Rolando Orellana.

RESUMEN

Se llevaron a cabo pruebas de transmisión de Leishmania mexicana mexicana utilizando hamsters y flebótomos en su mayoría capturados en los departamentos de Izabal, El Petén y El Progreso, en Guatemala. De un total de 413 moscas puestas a picar en hamsters infectados 101 lo hicieron. De éstas, 42 sobrevivieron y se pusieron a picar en hamsters no infectados, para probar la transmisión. Un total de 26 picaron esta segunda vez. Tres flebótomos de este grupo presentaron flagelados en el intestino pero no lograron transmitir la infección a los hamsters.

De las 101 que tomaron la comida infectiva, 92 se disectaron. Se encontraron 17 infectadas con promastigotes, produciendo los siguientes porcentajes de infección: 57.1% en Lutzomyia shannoni, 37.5% en Lu. ylephiletor, 14.0% en Lu. longipalpis y 5.8% en Lu. panamensis. Sin haber logrado la transmisión, se pudo concluir que Lu. shannoni y Lu. ylephiletor podrían ser vectores del Leishmania m. mexicana debido al alto porcentaje de infección que mostraron, sus características ecológicas y al desarrollo de los promastigotes dentro del intestino del insecto.

CONTENIDO

	página
RESUMEN	vii
I. INTRODUCCION	1
II. METODOS	8
III. RESULTADOS	15
IV. DISCUSION	24
A. Primeras transmisiones experimentales de <u>Leishmania</u>	24
B. Principales dificultades en la transmisión experimental por picadura	26
1. Cantidad de flebótomos	26
2. Establecimiento de la infección en los flebótomos	27
3. Sobrevivencia de los flebótomos	27
C. La especiación y el estudio de las leishmaniasis	29
D. Factores que determinan a un buen vector	29
1. Relación taxonómica a vectores conocidos	30
2. Ecología	30
3. Diferenciación del parásito de otros flagelados	32
4. Susceptibilidad de infección	33

	página
E. Desarrollo y estado infectivo del parásito en el vector	34
V. CONCLUSION	36
VI. LITERATURA CITADA	37

LISTA DE FIGURAS

Figura		página
1	Diagrama del tracto digestivo de un flebótomo	4
2	Diagrama de las espermatecas de diferentes especies de flebótomos	13
3	Muestra de la hoja empleada para llevar el registro de cada flebótomo	14

LISTA DE CUADROS

Cuadro		página
1	Distribución de lesiones de <u>L. mexicana</u> en el cuerpo humano	5
2	Porcentaje de picadura por diferentes especies de flebótomos en hamsters infectados	16
3	Errores en la clasificación de las especies de flebótomos	17
4	Tasa de infección por especie, en los flebótomos que picaron en hamsters infectados	18
5	Desarrollo de los parásitos en el tubo digestivo de los flebótomos	19
6	Relación entre la edad de la infección en el hamster y la presencia de infección en los flebótomos	20
7	Tiempo de desarrollo de la infección en los flebótomos a partir de la toma de sangre infectiva	22
8	Flebótomos que tuvieron la oportunidad de picar por segunda vez	23
9	Algunas consideraciones ecológicas sobre <u>Lu. shannoni</u> y <u>Lu. ylephiletor</u>	31

I. INTRODUCCION

La leishmaniasis cutánea del Nuevo Mundo es una infección de animales vertebrados que es transmisible al hombre. Puede ser causada por varias especies y subespecies de Leishmania. En el ser humano se manifiesta como una enfermedad ulcerativa crónica. Generalmente se presenta en las personas que entran al bosque.

En 1909, Linderberg y Carini & Paranhos (Faust, Russell y Jung, 1974; Zuckerman y Lainson, 1977) descubrieron la leishmaniasis cutánea en el Brasil, detectándola así por primera vez en el continente americano. Poco tiempo después, en 1912, Seidelin, registró su presencia en la península de Yucatán. En la actualidad se reconoce la distribución de esta enfermedad desde Yucatán, en el norte, hasta Argentina en el sur (Zuckerman y Lainson, 1977).

Inicialmente se pensó que todas las manifestaciones clínicas de este tipo de leishmaniasis, en América, eran causadas por un sólo parásito, Leishmania braziliensis Vianna 1913. Biagi en 1953 y Floch en 1954 (Zuckerman y Lainson, 1977), propusieron que eran tres los causantes, L. tropica mexicana en Yucatán, Guatemala y Belice; L. tropica braziliensis en el Brasil y L. tropica guayanensis en las Guyanas, Perú, Costa Rica y Panamá. Sin embargo, al encontrar evidencia de que este tipo de leishmania de las Américas no provenía del hemisferio oriental, Pessoa en 1961 (Zuckerman y Lainson, 1977), se refirió a los agentes etiológicos como L. braziliensis mexicana, L. braziliensis guayanensis y L.

braziliensis peruviana, respectivamente. Finalmente, en 1962, Garnham llamó al parásito presente en Yucatán, Guatemala y Belice, L. mexicana (Zuckerman y Lainson, 1977).

Después de haber encontrado muchos problemas al emplear la clasificación de la leishmaniasis cutánea basada únicamente en las manifestaciones clínicas, Lainson y Shaw (1972) propusieron una reorganización taxonómica. Esta se basa en todos los criterios disponibles sobre morfología, biología, inmunología y bioquímica.

Según Lainson y Shaw (1972), las leishmanias que causan leishmaniasis cutánea en el Nuevo Mundo se dividen en dos grupos bien definidos, el complejo de L. braziliensis y el complejo de L. mexicana. El complejo de L. braziliensis se encuentra distribuido desde Belice hasta Argentina (World Health Organization, 1984). Los huéspedes naturales son animales salvajes como roedores, prociónidos y titíes. En el hombre, los parásitos de este complejo producen pocas lesiones en la piel, que según la subespecie pueden variar desde las discretas que se curan por sí solas hasta las persistentes con metástasis al tejido nasofaríngeo o linfático. El complejo de L. mexicana se distribuye desde Yucatán hasta Brasil. Los huéspedes naturales son pequeños roedores del bosque y raras veces zarigüeyas. En el hombre produce lesiones cutáneas discretas o difusas, generalmente poco severas.

El ciclo de vida de las leishmanias en general, involucra una alternancia regular de huéspedes entre los flebotomíinos, que actúan como los vectores, y el vertebrado. En el transcurso de este ciclo, el parásito sufre profundos cambios biológicos, ya que repetidamente se transforma de amastigote a promastigote y viceversa. El amastigote es una forma sin movimiento, intracelular y parásita de macrófagos en los

vertebrados. El promastigote es mótil, extracelular y habitante del lumen intestinal de los insectos.

Aunque se sabe que la L. mexicana se transmite mecánicamente por medio de Stomoxys calcitrans (Lainson y Southgate, 1965 citado por Williams, 1970), únicamente en los flebotominos es donde estos parásitos se desarrollan cíclicamente y éstos son por lo tanto los vectores de la enfermedad.

Los flebotomos del Nuevo Mundo son de tres géneros: Brumptomyia, Lutzomyia y Warileya (Lewis et al., 1977), pero solamente Lutzomyia soporta el desarrollo cíclico de los parásitos y actúa como vector de Leishmania (Williams, 1970).

Las diferentes especies de Leishmania que producen infecciones en los flebotominos se caracterizan por diferencias en el desarrollo de los promastigotes en el tracto digestivo. La posición que ocupan los parásitos flagelados en el vector puede servir como una característica taxonómica confiable para la separación de los distintos complejos de Leishmania en el Nuevo Mundo (Johnson y Hertig, 1970).

El complejo de Leishmania braziliensis se desarrolla en el intestino medio y anterior y además en el posterior, donde los promastigotes se fijan predominantemente a las paredes del píloro y en menor proporción, en el íleon. El complejo de Leishmania mexicana solamente se desarrolla en el intestino medio y el anterior; el desarrollo en el posterior está ausente en su ciclo de vida (Lainson, Ward y Shaw, 1977). Ver figura 1.

Dentro del complejo de L. mexicana, Lainson y Shaw (1972) han definido tres subespecies basándose en estudios bioquímicos: L. mexicana mexicana, L. mexicana amazonensis y L. mexicana pifanoi. La L. mexicana

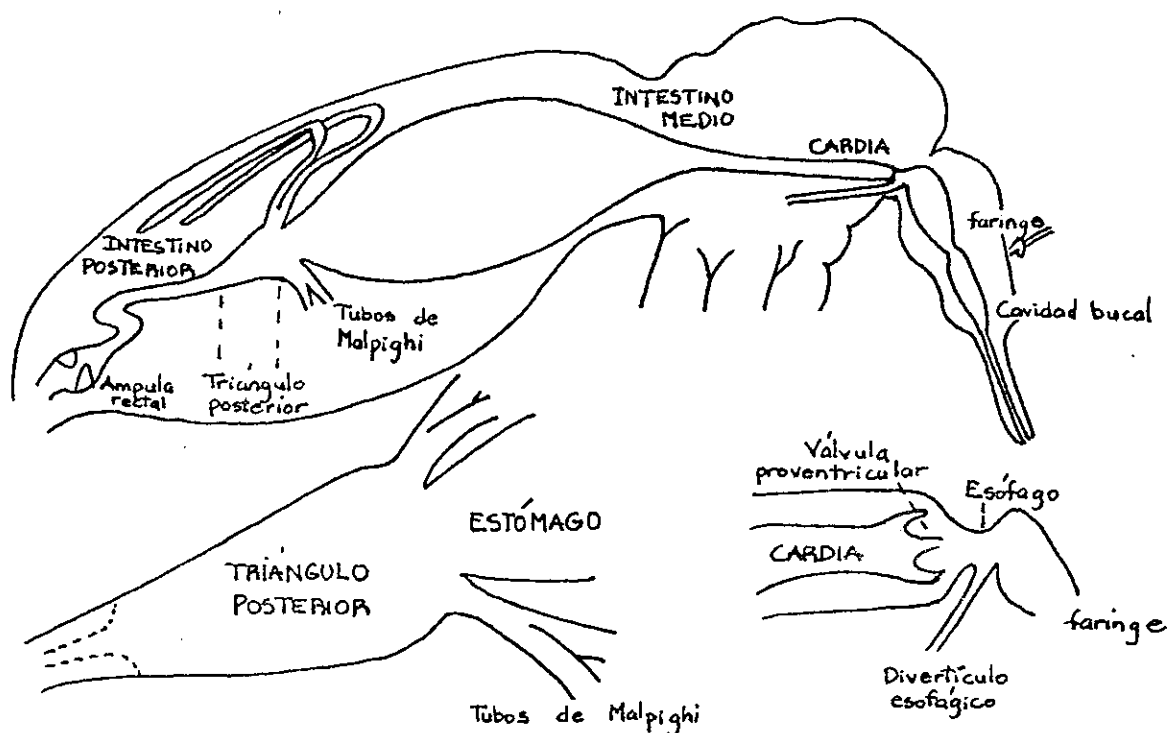


Figura 1. Diagrama del tracto digestivo de un flebotomo. (Tomado de Johnson y Hertig, 1970)

mexicana está constituida por parásitos cutáneos que se encuentran en los pequeños roedores de los bosques húmedos. Su distribución geográfica se limita a México, Guatemala y Belice; posiblemente a otras partes de Centro América. Su transmisión entre los huéspedes naturales se atribuye principalmente a Lutzomyia olmeca (Lainson y Shaw, 1972).

Como es el caso con otras especies de Leishmania, los seres humanos son huéspedes accidentales de L. m. mexicana (Williams, 1970). En las personas inmunológicamente competentes el parásito produce infecciones leves con una sola lesión cutánea que se cura por sí sola. La alta frecuencia de lesiones en la oreja es una característica de esta forma de

leishmaniasis pero pueden aparecer úlceras en cualquier parte del cuerpo (Cuadro 1). Las lesiones en el cuerpo tienden a eliminarse espontáneamente (Williams, 1970) pero las lesiones en las orejas, que constituyen el 40% de los casos (Lainson y Shaw, 1972), son crónicas y pueden causar una destrucción extensa de la pinna o pabellón de la oreja.

Cuadro 1. Distribución de lesiones de L. mexicana en el cuerpo humano
(Tomado de Williams, 1970)

Sitio de la lesión	Belice %	Península de Yucatán %
Orejas	54.8	50.3
Demás partes de la cabeza y cuello	12.2	24.4
Brazos y manos	18.4	15.8
Tronco	4.5	2.1
Piernas y piés	10.2	7.5

Leishmania mexicana mexicana puede establecerse en condiciones experimentales, alimentándose en lesiones de hamsters, en las siguientes especies: Lu. apicalis, Lu. hispinosus, Lu. cruciatus, Lu. geniculatus, Lu. ovallesi, Lu. pessoanus, Lu. shannoni y Lu. ylephiletor (Strangways-Dixon y Lainson, 1966). Experimentalmente, la transmisión del L. mexicana se ha logrado con Lu. longipalpis (Coelho y Falcao, 1962; Killick-Kendrick et al., 1977); con Lu. pessoana (Strangways-Dixon y Lainson, 1962 y 1966), aunque cabe la duda de que fuera Lu. panamensis;

con Lu. cruciata (Williams, 1966); y con Lu. flaviscutellata (Ward, Lainson y Shaw, 1977).

En Guatemala, la leishmaniasis cutánea fue reportada por primera vez en 1927 (Padilla-Bolaños, 1928). Este autor presentó un trabajo predominantemente bibliográfico y describió la lesión clásica de L. m. mexicana: una úlcera crónica en la oreja que puede llegar a destruir la pinna si no se recibe tratamiento. Esta lesión se conoce como la úlcera del chiclero porque los chicleiros al internarse en los bosques entran en contacto con los vectores continuamente y, por lo tanto, adquieren la enfermedad con mayor frecuencia.

Después del informe de Padilla-Bolaños, han habido otros trabajos de tesis sobre diferentes aspectos médicos de la L. m. mexicana: diagnóstico (Pérez-Guisasola, 1945), tratamiento (García-Salazar, 1973; Torres-Orellana, 1980), revisión bibliográfica (Godoy-Monroy, 1961). Además el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social ha llevado registros de los casos de esta enfermedad. En los últimos años se han estado realizando estudios experimentales preliminares sobre los flebótomos, en el laboratorio de Entomología Médica de la Universidad del Valle de Guatemala: especies antropofílicas presentes, tasas de infección natural y mantenimiento de colonias .

El ministerio de Salud Pública de Guatemala cuenta con un registro de casos de leishmaniasis cutánea. De 1957 a 1979 se registraron 524 casos distribuidos en cuatro departamentos de la región norte del país, en la siguiente forma: 7 en Alta Verapaz, 20 en Izabal, 28 en Quiché y 469 en Petén.

A pesar de este interés, no se han presentado informes sobre la transmisión experimental de L. m. mexicana en Guatemala. El presente trabajo tiene por objetivo identificar la potencialidad de tres especies de flebótomos encontradas en diferentes regiones del país, Lu. shannoni, Lu. ylephiletor y Lu. longipalpis, como vectores de este parásito. A pesar de que existen trabajos (citados anteriormente) sobre la transmisión experimental en Belice, este trabajo se justifica ya que existen diferencias entre las cepas geográficas de Leishmania en cuanto a su infectividad en la misma especie de flebotomino (Adler y Theodor, 1957).

II. METODOS

El objetivo planteado se trató de alcanzar a través del estudio de susceptibilidad de infección y de la posibilidad de transmisión de cada una de las especies elegidas de flebótomos. Se emplearon básicamente dos procedimientos generales: (1) la disección del flebótomo después de haber picado a los hamsters infectados y (2) la observación de lesiones en los hamsters no infectados después de haber sido picados por flebótomos infectados.

Entre las especies antropofílicas de flebótomos que se encuentran en Guatemala, se escogieron inicialmente tres para este estudio: Lu. shannoni, Lu. ylephiletor y Lu. longipalpis. Las dos primeras se eligieron porque en muestras colectadas en el norte de Guatemala, se observó que estas pueden encontrarse infectadas con promastigotes (C. H. Porter, comunicación personal). Lutzomyia longipalpis, a pesar de no encontrarse naturalmente infectada con L. mexicana, se escogió porque es considerada el principal vector de leishmaniasis visceral en el Nuevo Mundo y es una de las especies más empleadas en este tipo de estudio.

Inicialmente se pensaba trabajar solamente con las tres especies de flebótomos mencionadas. Sin embargo, debido a las dificultades encontradas en la captura de estos insectos, las pruebas se efectuaron con todas las especies disponibles en las colectas y además con algunos especímenes nacidos en el laboratorio. Se trabajó con un total de 413 flebótomos: 4 Lu. cruziata, 50 Lu. evansi, 154 Lu. longipalpis, 1 Lu.

olmeca olmeca, 132 Lu. panamensis, 45 Lu. shannoni, 1 Lu. undulata y 26 Lu. ylephiletor.

Idealmente los insectos usados en estudios de transmisión deben ser criados en el laboratorio. Esto permite controlar factores como la edad fisiológica; la paridad; las ingestas de sangre y azúcares; y otras condiciones físicas en su desarrollo como luz, temperatura y humedad. Pero debido a que los flebótomos son muy difíciles de reproducir y criar en el laboratorio, los insectos que se emplearon en esta investigación fueron 377 capturados en el campo y 36 criados en la colonia.

Para la captura de las tres especies de flebótomos se emplearon dos métodos: trampas de luz del tipo CDC y colecciones en los lugares donde los adultos descansan. La trampa de luz CDC consiste de una luz, producida por un foco de 4 V, que atrae a los insectos y de un ventilador, movido por un motor de 6 V, que los aspira a un compartimiento donde quedan atrapados. Además, Lu. shannoni y Lu. ylephiletor se colectaron directamente en la base de los árboles y Lu. longipalpis en los refugios nocturnos de cerdos y gallinas. Los lugares de colecta fueron los siguientes: para Lu. shannoni y Lu. ylephiletor en Finca Las Nubes y Cooperativa San Felipe Lara, municipio de Livingston, Izabal, y en Tikal, El Petén; para Lu. longipalpis en aldea Jocote y aldea Ixcanal, municipio de San Agustín Acasaguastlán, El Progreso. Estos sitios fueron seleccionados porque en colectas anteriores mostraron alta densidad de flebótomos.

La tasa de infección natural de Leishmania en los flebótomos es muy baja. En Lu. ylephiletor de 740 insectos disectados solo dos se encontraron infectados con promastigotes; de uno de estos insectos se

aisló una especie de Leishmania que posteriormente produjo una infección en un hamster (C. H. Porter, comunicación personal). Por otro lado, de 207 disecciones de Lu. shannoni solamente un insecto estuvo infectado con promastigotes (C. H. Porter, comunicación personal). Basándose en estos datos se asumió que era muy poco probable que se encontraran flebótomos naturalmente infectados. De cualquier forma, si se hubiera presentado alguno no habría afectado significativamente el experimento porque la tasa de infección experimental, adquirida picando hamsters oscila aproximadamente entre 45% y 95% según estudios publicados (Strangways-Dixon y Iainson, 1966; Hertig, Johnson y McConnell, 1969; Christensen y Herrero, 1980).

Después de su captura, los insectos se alimentaban individualmente tan pronto como era posible en hamsters infectados (a esta ingestión se le llamará la primera toma de sangre). Para aumentar la probabilidad de que picaran en la lesión del hamster, los flebótomos eran mantenidos dentro de pequeños frascos transparentes sin tapadera, colocados con la abertura sobre el área de la lesión. En los casos en que las moscas se mostraban renuentes a alimentarse, se le daba a cada una un tiempo mínimo de 10 minutos para picar al hamster. Esta oportunidad se repetía diariamente hasta que picaran, mientras los flebótomos permanecían vivos.

Los hamsters infectados que se emplearon habían adquirido la infección mediante el inóculo inyectado de una de estas tres cepas de L. m. mexicana: (1) Una cepa humana de un paciente residente en el Cruce de Chinchilá, San Luis, Petén, con una lesión en el brazo de cuatro meses de duración; la muestra se obtuvo en junio de 1981. (2) Una cepa humana de un paciente residente en el Caserío Cangrejal, San Luis, Petén, con una

lesión en la pierna de tres meses de duración; la muestra se obtuvo en junio de 1981. (3) Una cepa de un flebótomo, Lu. ylephiletor, capturado en la Cooperativa San Felipe Lara, Livingstone, Izabal, en septiembre de 1981. En los casos de las cepas humanas, los primeros hamsters se infectaron inyectando los parásitos que se habían extraído directamente de las lesiones. En el caso de la cepa del flebótomo, el inóculo se adquirió al hacer la disección del insecto. Después de estas primeras inoculaciones, las cepas de L. m. mexicana se han mantenido inoculando periódicamente a otros hamsters.

Los hamsters se anestesiaban cuando los flebótomos se alimentaban en ellos. Esto evitaba que se pusieran inquietos y que por lo tanto impidieran el ser picados. Se empleaba una dosis aproximada de 0.4 mg de pentobarbital sódico por 10 g de peso del animal, equivalente aproximadamente a 0.15 ml por individuo.

Inmediatamente después de haber sido alimentados, los flebótomos se colocaban en frascos de Hilton. Estos son transparentes, pequeños y sus tapaderas tienen un boquete cubierto con cedazo de hoyo pequeño. En el fondo de cada frasco había una capa de yeso húmedo y un trocito de manzana; sobre la tapadera había un poco de algodón humedecido con una solución de miel de abeja al 7%. Los frascos se mantuvieron a una temperatura de 19 a 21^oC y a una humedad relativa de por lo menos 80%.

Para intentar la transmisión, los flebótomos que habían tomado sangre de hamsters infectados eran puestos a picar en hamsters no infectados (a esta ingestión de sangre se le llamará la segunda toma de sangre), antes de oviponer en el caso de Lu. longipalpis y después con las otras dos especies. En el caso de Lu. longipalpis, se ponían a picar antes de

oviponer porque estos flebótomos generalmente mueren en el acto de oviposición o durante las 24 horas siguientes y, por otro lado, se ha reportado que esta inducción a picar antes de la oviposición es posible en un tercio de los casos (Killick-Kendrick et al., 1977). Estos hamsters se mantenían en jaulas diferentes a las de los infectados y luego se seguían observando para encontrar evidencia de infección. De 23 a 27 días después de la inoculación de los hamsters con L. mexicana, típicamente se produce un histiocitoma en la piel en el lugar de la inoculación (Ward et al., 1977).

Los flebótomos eran disectados después de picar por segunda vez. De esta forma se observaba la presencia de promastigotes y el estado de desarrollo de la infección en el intestino del insecto. Se disectaban inmediatamente los flebótomos que se morían antes de picar por segunda vez.

Los flebótomos permanecían en el refrigerador hasta unos minutos antes de la disección. Inmediatamente después de sacarlos del refrigerador, se inmovilizaban y se les quitaban los pelos agregando unas pocas gotas de solución salina 0.85% conteniendo 1% de detergente doméstico. Se agitaban en esta solución por unos pocos segundos y luego se colocaban en unas gotas de solución salina sin detergente, sobre un portaobjetos. Se cortaba la cabeza, se hacían pequeños cortes en la cutícula de los últimos segmentos abdominales y se extraían el tubo digestivo y los ovarios por la parte posterior. Se colocaba un cubreobjetos. Las muestras preparadas se examinaban bajo un microscopio de contraste de fase a 100X y 400X.

La verificación de la especie de los flebótomos se realizaba durante

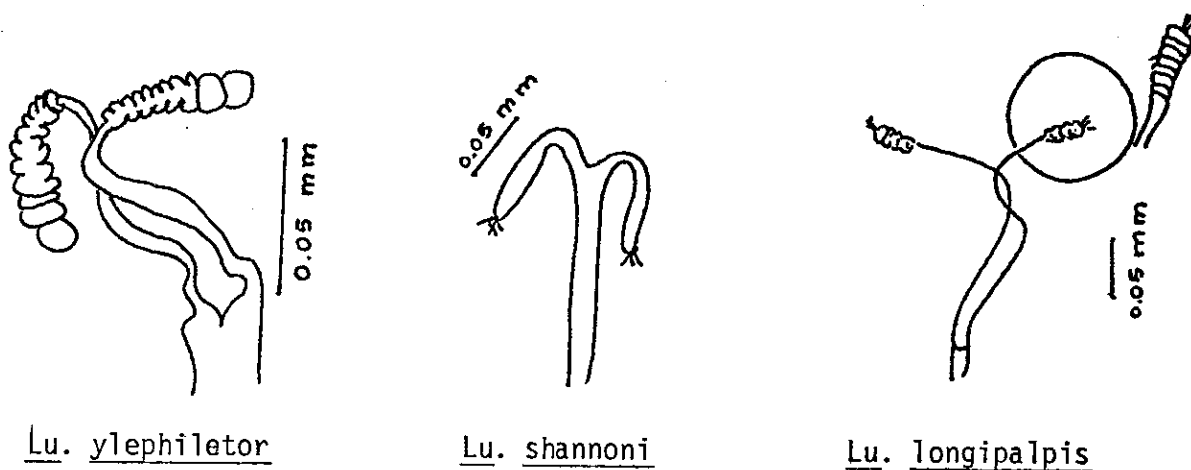


Figura 2. Diagrama de las espermatecas de diferentes especies de flebótomos. (Tomado de Young, 1979).

la disección. La identificación taxonómica se basaba en las características de las espermatecas (figura 2). Normalmente, estas pueden observarse claramente en solución salina; en el caso contrario debían agregarse unas gotas de solución concentrada de fenol en alcohol etílico al 100%.

Se llevaban registros individuales de los flebótomos con los cuales se quería transmitir la infección (figura 3).

Figura 3. Muestra de la hoja empleada para llevar el registro de cada flebotomo.

NO. IDENTIFICACION: _____ ESPECIE: _____
 NACIMIENTO EN COLONIA: FECHA: _____ CAPTURA EN EL CAMPO FECHA: _____
 MACHO: SI NO LUGAR: _____

	fecha	ingestión	Lugar piquete	datos hamster	infección hamster
1er TOMA SANGRE					

OPORTUNIDAD DE 2da TOMA DE SANGRE: SI NO OBSERVACIONES: _____

	fecha	huevos puestos	sí/no	Lugar piquete	datos infección en hamster
2da TOMA SANGRE					

DISECCION	fecha	parte infectada		midgut con sangre	No. huevos	condición espermateca
		foregut	midgut			
confirmación especie		glándulas accesorias		OBSERVACIONES		

III. RESULTADOS

De un total de 413 moscas puestas a picar 101 lo hicieron (Cuadro 2). Para cuestión de análisis no se tomaron en cuenta los especímenes de Lu. cruciata, Lu. olmeca y Lu. undulata ya que el número de cada especie era menor a cinco individuos. Los porcentajes más altos de picadura en hamsters infectados corresponden a Lu. ylephiletor, 65.4%, y Lu. longipalpis, 29.9%.

Al confirmar la identificación de las especies a través de la disección de las espermatecas en los 101 flebótomos que picaron, se encontró discrepancia entre la clasificación a simple vista y la basada en las espermatecas en dos especies. De un total de 16 supuestos Lu. shannoni, 9 eran Lu. ylephiletor y 1 Lu. undulata y de un total de 10 supuestos Lu. ylephiletor, 1 era Lu. shannoni y 2 Lu. panamensis (Cuadro 3).

Tomando en cuenta estos errores de clasificación, podría estimarse que de los 45 flebótomos identificados a simple vista como Lu. shannoni sólo 17 (37.5%) eran realmente de esa especie y que de los 26 supuestos Lu. ylephiletor sólo 16 (60.0%) lo eran. Considerando estas estimaciones a Lu. shannoni le correspondería un porcentaje de picadura de 35.3% y a Lu. ylephiletor de 43.7%. De cualquier forma se conservó el porcentaje de picadura más alto para Lu. ylephiletor.

Cuadro 2. Porcentaje de picadura por diferentes especies de flebótomos en hamsters infectados

Especie	No. puestos a picar *	No. que picaron (%)
<u>Lu. cruciata</u>	4	0 (0.0)
<u>Lu. evansi</u> +	50	6 (12.0)
<u>Lu. longipalpis</u> +	154	46 (29.9)
<u>Lu. olmeca olmeca</u>	1	1 (100.0)
<u>Lu. panamensis</u> +	132	22 (16.7)
<u>Lu. shannoni</u> ** +	45	8 (17.8)
<u>Lu. undulata</u>	1	1 (100.0)
<u>Lu. ylephiletor</u> ** +	26	17 (65.4)
TOTAL	413	101 (24.5)

* Para picar se les dió a todas las moscas un tiempo mínimo de 10 minutos

** Hubo errores en la clasificación de estas dos especies.

+ Todas las diferencias son significativas para $p < 0.001$;
 $\chi^2 = 35.767$; g.l.=4

Cuadro 3. Errores en la clasificación de las especies de flebótomos. *

Espece	No. según la clasificación de organismos vivos	No. según la disección de la espermateca
<u>Lu. cruciata</u>	0	-
<u>Lu. evansi</u>	3	3
<u>Lu. longipalpis</u>	43	43
<u>Lu. olmeca olmeca</u>	1	1
<u>Lu. panamensis</u>	19	19
<u>Lu. shannoni</u>	16	6
<u>Lu. ylephiletor</u>	10	7

* Inicialmente sólo se disectaron los flebótomos que picaron por lo menos la primera vez. Al encontrar las discrepancias se empezaron a disectar todos.

En el Cuadro 4 se muestran los resultados de infección de los diferentes especímenes de las distintas especies que picaron en hamsters infectados. El número de flebótomos en este cuadro no concuerda con los del Cuadro 2 debido a que se tomaron en cuenta las identificaciones correctas de las especies según la disección de las espermatecas y se descartaron los que habían picado pero que no pudieron disectarse. Las razones que en algunos casos impidieron las disecciones fueron básicamente dos: (1) los insectos eran dañados severamente en forma accidental antes de hacer la disección y (2) los insectos habían muerto más de 24 horas antes de la disección.

Cuadro 4. Tasa de infección por especie, en los flebótomos que picaron hamsters infectados.

Especies	No. que picaron y fueron disectados	No. infectados (%)
<u>Lu. evansi</u>	3	0 (0.0)
<u>Lu. longipalpis</u> *	43	6 (14.0)
<u>Lu. olmeca olmeca</u>	1	0 (0.0)
<u>Lu. panamensis</u> *	21	1 (5.8)
<u>Lu. shannoni</u> *	7	4 (57.1)
<u>Lu. undulata</u>	1	0 (0.0)
<u>Lu. ylephiletor</u> *	16	6 (37.5)

* Entre estas especies las diferencias son significativas para $0.01 > p > 0.001$; $\chi^2 = 14.646$; g.l.=3

De 92 flebótomos disectados que tomaron sangre en hamsters infectados, un total de 17 se encontraron infectados con flagelados. Las especies encontradas con los porcentajes de infección más altos fueron Lu. shannoni con 57.1% y Lu. ylephiletor con 37.5%. Lutzomyia longipalpis y Lu. panamensis mostraron porcentajes relativamente bajos, 14.0% y 5.8% respectivamente (Cuadro 4).

En la mayoría de los flebótomos infectados de las diferentes especies, la infección era generalizada en todo el tubo digestivo (Cuadro 5).

Cuadro 5. Desarrollo de los parásitos en el tubo digestivo de los flebótomos.

Especie	No. examinados	Sitio de la infección intestinal		
		anterior No. (%)	medio No. (%)	posterior No. (%)
<u>Lu. longipalpis</u>	6	5 (83.3)	3 (50.0)	3 (50.0)
<u>Lu. panamensis</u>	1	1 (100.0)	1 (100.0)	1 (100.0)
<u>Lu. shannoni</u>	4	4 (100.0)	4 (100.0)	4 (100.0)
<u>Lu. ylephiletor</u>	6	6 (100.0)	6 (100.0)	5 (83.3)

Todos los flebótomos infectados mostraron un porcentaje de infección muy alto en el intestino anterior-medio, presentándose en todos los casos de Lu. panamensis, Lu. shannoni y Lu. ylephiletor; cinco de seis Lu. longipalpis tenían una infección en el intestino anterior-medio. Sin embargo, en estas mismas especies la infección de la parte posterior fue de por lo menos 50%. En tres de seis Lu. longipalpis y uno de seis Lu. ylephiletor hubo infecciones en la parte anterior pero no en la posterior. Solamente en Lu. longipalpis se encontró un caso con infección en la parte posterior del intestino pero no en la anterior.

Se analizó si existía alguna relación entre la edad y tipo de infección cutánea de Leishmania en el hamster con la infección en el flebótomo. Se tomaron estos aspectos en cuenta ya que por ser la leishmaniasis cutánea una enfermedad que puede curarse por sí sola, la edad y el tipo de lesión podría afectar el número de parásitos presentes. Con respecto a la edad de la infección en el hamster, no se

encontró ningún patrón que mostrara relación alguna (Cuadro 6). Los porcentajes más altos de infección según la edad de la infección en el hamster fueron los siguientes: 50% en las infecciones de ocho meses, 44% en las de 22 meses y 25% en las de 24 meses.

Cuadro 6. Relación entre la edad de la infección en el hamster y la presencia de infección en los flebotomos.

Edad de infección en hamsters (meses)	No. de flebotomos que picaron	No. (%) de flebotomos que se infectaron
1	2	0 (0.0)
2	17	1 (5.9)
3	6	1 (16.6)
4	13	2 (15.4)
5	7	0 (0.0)
6	4	0 (0.0)
8*	12	6 (50.0)
9	2	0 (0.0)
10	1	1 (100.0)
14	3	0 (0.0)
15	3	0 (0.0)
22*	9	4 (44.4)
24*	8	2 (25.0)

* No se aplica ninguna prueba estadística porque las frecuencias son menores de cinco en más del 20% de los casos.

El tracto alimenticio de los flebótomos alimentados y no alimentados es bacteriológicamente estéril y la contaminación puede interferir con la digestión de la sangre y puede ser fatal para el insecto (Adler y Theodor, 1957). De 20 flebótomos severamente infectados con bacterias y hongos se encontró infección con Leishmania en dos(10%) y de 72 sin infección bacteriana y micótica se encontró Leishmania en 15(21%). Esta diferencia no es significativa ($p= 0.155$).

Ya que las infecciones bacterianas y/o micóticas pueden interferir con el desarrollo de la Leishmania, se analizó la relación entre la presencia o ausencia de una úlcera cutánea en el hamster, asociada generalmente con una infección secundaria, y la tasa de infección de Leishmania en los flebótomos. No se encontró ninguna relación entre estos dos factores, ya que de 39 moscas que picaron en hamsters sin úlcera y de 21 que picaron directamente o en la orilla de una úlcera 23.1% y 28.6% respectivamente, se infectaron con promastigotes. Esta diferencia no es significativa ($p>0.50$).

El cuadro 7 muestra los datos sobre el tiempo de desarrollo de la infección en los flebótomos, a partir de la toma de sangre infectiva. En Lu. longipalpis y Lu. ylephiletor las primeras infecciones aparecieron desde el cuarto día y en Lu. panamensis en el quinto. En Lu. shannoni las primeras infecciones se observaron en el quinto día pero no se hicieron disecciones antes de este tiempo. Ya que el propósito de este proyecto era demostrar la transmisión de Leishmania por los flebótomos, en ningún caso se disectaron antes del tercer día. Las infecciones más viejas registradas fueron de 10 días en Lu. longipalpis y de siete días en Lu. shannoni y Lu. ylephiletor.

Cuadro 7. Tiempo de desarrollo de la infección en los flebótomos a partir de la toma de sangre infectiva.

No. de días después de la toma de sangre infectiva	No. de flebótomos infectados/total disectados			
	<u>Lu. longipalpis</u>	<u>Lu. panamensis</u>	<u>Lu. shannoni</u>	<u>Lu. ylephiletor</u>
3	0/3	0/1	-/-	0/1
4	2/12	0/8	-/-	1/1
5	1/6	1/11	2/3	1/6
6	0/1	0/1	1/3	3/4
7	0/2	-/-	1/1	1/4
8	0/7	-/-	-/-	-/-
9	1/6	-/-	-/-	-/-
10	2/3	-/-	-/-	-/-

Lograron ponerse a picar por segunda vez solamente 42 flebótomos de un total de 101 que picaron por primera vez (Cuadro 8). De estos 42, 26 picaron por segunda vez: 5 de 6 Lu. panamensis, 5 de 7 Lu. ylephiletor y 16 de 27 Lu. longipalpis. De estos 26 únicamente tres estaban infectado: 1 Lu. ylephiletor y 2 Lu. longipalpis. El espécimen de Lu. ylephiletor picó en la pata de un hamster llenándose de sangre completamente. Uno de los Lu. longipalpis infectado probó una vez sobre el abdomen rasurado de un hamster. El segundo Lu. longipalpis ingirió parcialmente sangre al picar sobre el abdomen de otro hamster. Después de 12 y 11 meses respectivamente no se observaron lesiones en los hamsters.

Cuadro 8. Flebótomos que tuvieron la oportunidad de picar por segunda vez.

Especie	No. puestos a picar por segunda vez	No. que picaron por segunda vez	No. (%) de infectados que picaron por segunda vez
<u>Lu. longipalpis</u>	27	16	2 (12.5)
<u>Lu. panamensis</u>	6	5	0 (0.0)
<u>Lu. shannoni</u>	2	0	- -
<u>Lu. ylephiletor</u>	7	5	1 (20.0)

Sacks y Perkins (1984) afirman que las condiciones de crecimiento de los promastigotes determinan la generación del estado infectivo. La presencia o ausencia de sangre en el intestino de los flebótomos infectados condiciona las características nutricionales del medio, en el que se desarrollan los promastigotes. Por lo tanto, debe mencionarse que en los dos Lu. longipalpis y en el Lu. ylephiletor infectados que picaron por segunda vez, había sangre en el intestino.

IV. DISCUSION

A. Primeras transmisiones experimentales de Leishmania

Desde hace mucho tiempo se sabe que las especies de flebótomos están involucradas en la transmisión de leishmaniasis en todo el Nuevo Mundo. Sin embargo, la transmisión experimental de Leishmania ha sido difícil de lograr.

Después de muchos fracasos (Shortt, Craighead y Swaminath, 1928), Shortt et al. (1931) reportaron la primera transmisión cíclica de Leishmania por la picadura de un flebótomo infectado experimentalmente, a un hamster chino, después de que este hamster había sido picado por lo menos por 38 Phlebotomus infectados con L. donovani. Resultados similares fueron reportados por Napier, Smith y Krishnan (1933) y Smith et al. (1936). En estos experimentos las moscas infectadas fueron alimentadas únicamente con sangre. Cuando fueron provistas con pasas después de una comida infectiva, Smith, Halder y Ahmed (1940) lograron infectar cinco de cinco hamsters chinos y dos de ocho ratones blancos por el promedio de picadura de 10 (rango de seis a 32) moscas infectadas. Smith, Halder y Ahmed (1941) en un experimento controlado para demostrar el efecto de las pasas, detectaron infecciones en cinco de cinco hamsters dorados picados por flebótomos mantenidos con pasas pero no detectaron ninguna en cuatro de cuatro hamsters picados por moscas mantenidas únicamente con sangre. Esto llevó a la primera transmisión experimental incontrovertible de L. donovani al hombre por la picadura de P.

argentipes (Swaminath, Shortt y Anderson, 1942). Con esta serie de experimentos se comprobó la importancia de la comida de azúcares en la transmisión experimental.

Dificultades similares se encontraron al tratar de transmitir cíclicamente L. tropica (Adler y Theodor, 1929). Después de muchos fracasos, Adler y Ber (1941) transmitieron experimentalmente L. tropica a voluntarios humanos por las picaduras de P. papatasi. Se pensó que algunas razones posibles para este logro fueron que los flebótomos se mantuvieron a una temperatura constante (30°C) mayor a la usada en otros experimentos anteriores o que habían sido infectados al ser alimentados con flagelados suspendidos en una solución de alta salinidad.

La transmisión experimental de L. mexicana se ha logrado con la picadura única de Lu. longipalpis, Lu. renei y Lu. pessoana en 1962 (Coelho y Falcao; Strangways-Dixon y Lainson) y de Lu. cruciata y Lu. flaviscutellata en 1966 (Williams, 1966; Ward et al., 1977). En estos casos el éxito de la transmisión no se atribuyó a ninguna condición especial.

En estos primeros casos de transmisión experimental de Leishmania se detectaron, en resumen, dos factores que afectan la transmisión: la toma de azúcares y la temperatura a la cual se mantienen los flebótomos. Ambos aspectos se tomaron en cuenta en este experimento. A pesar de que Lu. shannoni y Lu. ylephiletor mostraron un alto porcentaje de infección, 57.1% y 37.5% respectivamente, no produjeron resultados positivos en la transmisión. Esto posiblemente se debió a la falta de alguna condición esencial, aún desconocida, para la transmisión de la leishmaniasis cutánea. Sin embargo Warburg y Schlein (1986) afirman que aparentemente

no hay un sólo factor nutricional esencial para la transmisión de Leishmania.

B. Principales dificultades en la transmisión experimental por picadura

Existen principalmente tres dificultades en la transmisión experimental de Leishmania por picadura: (1) la obtención de una cantidad suficiente de flebótomos, (2) el establecimiento de la infección en la mosca y (3) la baja sobrevivencia de los flebótomos que impide picar por segunda vez.

1. Cantidad de flebótomos. En la ejecución de este trabajo, la

obtención de una cantidad suficiente de flebótomos limitó mucho los resultados. Las colecciones de flebótomos en el campo no suministraron cantidades grandes de especímenes, por distintas razones. El material colectado en las diferentes excursiones era poco comparado con el que se había podido obtener en otras ocasiones, posiblemente debido a las condiciones climatológicas existentes durante la época de colectas, realizadas durante el año 1983. En Izabal dos colectas fueron durante la primera quincena del mes de junio y la otra en los primeros días de noviembre; en El Progreso a finales de los meses de junio y a mediado de septiembre; en Tikal a mediados del mes de julio. Según Lewis (1971), las especies antropofílicas de flebótomos son más numerosas en la estación lluviosa. A pesar de que los meses de las colectas generalmente corresponden a esta estación, en este caso había llovido poco.

Además entre los especímenes colectados, muchos morían antes de llegar al laboratorio por el exceso de calor, a pesar de que en el campo los flebótomos eran colocados, lo más pronto posible, en cajas de cartón

dentro de hieleras. Por otro lado, entre los que lograban sobrevivir, un porcentaje muy bajo era adecuado para el experimento ya que la gran mayoría eran machos o hembras grávidas. Por ejemplo, durante el viaje de campo a Izabal en el mes de junio, después de colocar seis trampas de luz CDC por dos noches completas y de recolectar al pie de los árboles durante tres días, con un promedio de seis horas efectivas por tres personas con experiencia, al llegar al laboratorio en la ciudad de Guatemala sólo se obtuvieron 12 flebótomos hembras no grávidas. Estos problemas hicieron que la muestra fuera reducida.

2. Establecimiento de la infección en los flebótomos. De 413

moscas que se pusieron a picar 101 lo hicieron. De estas se disectaron 92 y 17 estaban infectadas. Estos datos señalan la dificultad del establecimiento de la infección en los flebótomos.

Las condiciones en las cuales los parásitos colonizan el intestino anterior de las moscas no se conoce claramente y el desarrollo completo de Lesihmania con invasión de la proboscis, necesaria para la transmisión, normalmente se lleva a cabo en muy pocas moscas infectadas o en ninguna (Killick-Kendrick et al., 1977). Esto ha hecho imposible conocer todos los factores determinantes en el establecimiento de la infección y la transmisión. Este desconocimiento podría estar ocasionando las limitaciones observadas en los bajos porcentajes de infección y en las dificultades de transmisión.

3. Sobrevivencia de los flebótomos. Las condiciones en las cuales se mantienen los flebótomos en el laboratorio podrían tener muy poca relación con las encontradas en la naturaleza y por lo tanto afectarían no sólo su comportamiento sino también su sobrevivencia. Por esta razón,

los resultados obtenidos en trabajos experimentales deben ser interpretados con mucho cuidado. Por ejemplo, se sabe que la toma de azúcar influye en la toma de sangre y en el desarrollo de los parásitos en el intestino de la mosca (Williams, 1970), aunque no se ha determinado su acción directa. Es posible que los tipos de azúcares presentes y la proporción en las fuentes naturales sean esenciales para el desarrollo completo de Leishmania, en el intestino anterior de los flebótomos. Lewis y Domoney (1966) detectaron diferentes azúcares en el líquido encontrado en el divertículo esofágico: fructosa en Lu. ovallesi, Lu. shannoni y Lu. crucita y fructosa y trazas de glucosa, sacarosa, maltosa, melibiosa y rafinosa en Lu. ylephiletor.

En los trabajos sobre la transmisión experimental de leishmaniasis es usual encontrar reportado la dificultad que hay en lograr que los flebótomos piquen por segunda vez, en relación con su baja sobrevivencia. Killick-Kendrick et al. (1977) al trabajar con el mantenimiento de una colonia de Lu. longipalpis reportaron que al oviponer es rara la mosca que sobrevive más de 24 horas y que la mayoría mueren durante la oviposición. De un total de 101 flebótomos que picaron por primera vez, 42 picaron por segunda vez. El resto murió antes de oviponer, durante la oviposición o muy pocas horas después de oviponer.

En este trabajo, entre los flebótomos que lograron picar por segunda vez, la mayoría no estaban infectados: 5 de 5 Lu. panamensis, 4 de 5 Lu. ylephiletor y 14 de 16 Lu. longipalpis; en total 23 de 26 no estaban infectados. Esto podría indicar que los parásitos interfieren con el funcionamiento de los sensilios en el cibario de las moscas, que según el trabajo con otros dípteros hematófagos, se presume que reconoce el

alimento y controlan la toma del mismo (Killick-Kendrick et al., 1977). Sin embargo esta suposición no es apoyada por resultados como los de Warburg y Schlein (1986) en los cuales los promastigotes en el cibario de los flebótomos que transmitieron la Leishmania se encontraron libres en pequeña cantidad o ninguno adherido.

C. La especiación y el estudio de las leishmaniasis

En 1914 Adler (Zuckerman y Lainson, 1977) resumió la situación tan compleja en el Nuevo Mundo, con respecto a la leishmaniasis y la especiación. Las leishmanias en los mamíferos han sufrido mayor especiación en el Nuevo Mundo que en el Viejo y cada especie podría tener sus propios vectores, reservorios y espectros de infectividad del hospedero. Existen además diferencias entre las cepas geográficas de Leishmania. En los trabajos de laboratorio esta complejidad podría producir falsos resultados de infectividad en las especies de flebótomos.

Por otro lado, la especiación del género Lutzomyia también ha sido muy compleja y extensa. Algunas especies de flebótomos del Nuevo Mundo parecen no tener ninguna preferencia alimenticia. Muchas especies diferentes de moscas pueden estar asociadas con un mismo mamífero. El desarrollo completo de Leishmania podría no estar limitado solamente a algunas especies del flebótomos (Killick-Kendrick et al., 1977). Estos aspectos mencionados podrían ser la causa de un establecimiento artificial de especificidad entre especies del flebótomos y de Leishmania en el laboratorio.

D. Factores que determina a un buen vector

Según Lewis (1974), idealmente deberían estudiarse todos los

siguientes aspectos para determinar hasta qué punto una especie actúa como vector de una enfermedad, al mismo tiempo se llevan a cabo estudios de transmisión. (1) La relación taxonómica a vectores conocidos. (2) Ecología: distribución, focalidad, rango altitudinal en los bosques, población, cambios estacionales, preferencia por reservorios, tiempo y lugar en el cual las personas son picadas, tasas de infección natural. (3) La diferenciación de los parásitos encontrados de otros flagelados. (4) Consideraciones sobre el número de parásitos en el donante; susceptibilidad de infección resultante; intensidad, persistencia y desarrollo de los promastigotes en el vector y la identificación del estado infectivo de los promastigotes.

1. Relación taxonómica a vectores conocidos. En el caso de la

leishmaniasis en el Nuevo Mundo, la posición taxonómica puede no ser una guía para la determinación de un buen vector, porque todos los vectores se encuentran dentro del género Lutzomyia (Lewis, 1971).

2. Ecología. Ya que existen condiciones ecológicas determinantes,

como la afinidad por picar a los animales reservorios y al hombre, la abundancia en los lugares donde se encuentra la enfermedad y el comportamiento general del insecto, en especial sus hábitos alimentarios, las observaciones de flebótomos en condiciones experimentales tienen un valor limitado para definir la importancia de una especie como transmisor. Sin embargo, es posible encontrar datos acerca de la ecología de algunas de las especies con las cuales se experimentaron en el presente trabajo, pero siempre en regiones fuera de Guatemala. En el Cuadro 9 se presenta información publicada por Disney (1968) y Williams (1970), sobre sus trabajos de leishmaniasis en Honduras Británica

(Belice), a cerca de las dos especies que presentaron mayor susceptibilidad a la infección.

Cuadro 9. Algunas consideraciones ecológicas sobre Lu. shannoni y Lu. ylephiletor.

<u>Aspecto</u>	<u>Lu. shannoni</u>	<u>Lu. ylephiletor</u>
Actividad dial **	Estrictamente nocturno para tomar sangre; con un pico de 19:00 a 19:59	Señales de actividad durante el día; con un pico de 19:00 a 19:59
Comidad de sangre **	Comen rápido y causan poca irritación	Comen rápido y causan poca irritación
Distribución vertical en el bosque con cebo humano **	Se encuentran desde el nivel del suelo hasta los 40 pies; densidad un poco mayor a los 25 y 40 pies	Se encuentran desde el nivel del suelo hasta los 40 pies; densidad un poco mayor a los 25 y 40 pies
Hembras capturadas en trampas con mamíferos como cebo *	<u>Didelphis</u> <u>Heteromys</u> <u>Nyctomys</u> <u>Ototylomys</u> <u>Philander</u> <u>Sciurius</u> <u>Tylomys</u>	<u>Didelphis</u> <u>Nyctomys</u> <u>Ototylomys</u>

* Según Disney (1968)

** Según Williams (1970)

Al analizar los datos sobre actividad dial, comidas de sangre, distribución vertical en el bosque y captura de hembras en trampas con cebo mamífero, puede decirse que ninguno de estos aspectos niega la posibilidad de que Lu. shannoni y Lu. ylephiletor actúen como

transmisores de Leishmania. Por el contrario señalan características que favorecerían la transmisión. El hecho de que tomen sangre rápido causando poca irritación, aumenta la probabilidad de que piquen al hombre antes de que este se dé cuenta. Su distribución en los bosques desde el suelo hasta los 40 pies (13.3 m), les permite estar en contacto con el hombre y reservorios en el suelo o los árboles. El ser atraídos a diferentes mamíferos, podría indicar la afinidad por diferentes reservorios.

3. Diferenciación del parásito de otros flagelados. El patrón de crecimiento de las leishmanias en el intestino de los flebótomos se ha estudiado como un método efectivo para diferenciar entre especies de estos parásitos. La presencia de promastigotes de Leishmania en el intestino posterior de los flebótomos puede interpretarse como (1) la representación de una forma infectiva, (2) una etapa de desarrollo de la forma infectiva y (3) una infección que muere en una especie que no es vector (Anderson y Ayala, 1969). La L. mexicana se caracteriza por el crecimiento de promastigotes solamente en la parte anterior y media del intestino del insecto (Lainson et al., 1977; Strangways-Dixon y Lainson, 1966). Lutzomyia shannoni y Lu. ylephiletor, que son las dos especies que presentaron el porcentaje más alto de infección en este trabajo, mostraron en todos los casos infección en la parte anterior-media del tubo digestivo pero también hubo presencia de promastigotes en la parte posterior en 4 de 4 Lu. shannoni y en 5 de 6 Lu. ylephiletor. La presencia de promastigotes en la parte posterior puede deberse a (1) los movimientos peristálticos violentos del intestino y a la presión ejercida por el cubreobjetos durante la disección, (2) la inhabilidad del parásito

de establecerse en el insecto por lo que son expulsados en las heces y (3) a que se trate de L. braziliensis en lugar de L. mexicana

Una forma de diferenciar entre estas tres causas es a través de la morfología y fijación al epitelio intestinal, observadas en los promastigotes (Lainson et al., 1977). Si los promastigotes no están adheridos a la pared del intestino, tienen forma elongada y nadan activamente entonces la causa es alguna de las dos primeras que se mencionaron. Por lo contrario, si los flagelados están adheridos a la pared intestinal y tienen forma redonda u ovalada entonces se trata de L. braziliensis. Desafortunadamente, los aspectos de morfología y fijación no pueden definirse claramente si no se tiene experiencia.

Sin embargo, el hecho de que la presencia de promastigotes en el intestino posterior se deba al establecimiento de L. braziliensis podría descartarse. Primero, porque la probabilidad de que los flebótomos vinieran infectados del campo es muy baja, ya que las tasas de infección natural para Lu. shannoni y Lu. ylephiletor también lo son. Y segundo, porque la fuente inicial de la infección de los hamsters empleados corresponde a lesiones humanas típicas de L. m. mexicana.

4. Susceptibilidad de infección. Un aspecto que influye en la potencialidad de un vector es su susceptibilidad a la infección. Un buen vector se caracteriza por una tasa de infección alta, después de la ingestión de relativamente pocos parásitos (Lewis, 1971). En este trabajo los porcentajes más altos de infección corresponden a Lu. shannoni (57.1%) y Lu. ylephiletor (37.5%) (Cuadro 3). Estos porcentajes de infección experimental como las tasas de infección natural encontradas por C. H. Porter (datos no publicados), en las disecciones de flebótomos

antropofílicos colectados en Guatemala, indican que Lu. shannoni es más susceptible de infección que Lu. ylephiletor. Estas infecciones confirman el hecho de que Lu. shannoni y Lu. ylephiletor se infectaron al alimentarse en lesiones de hamsters , reportado por Strangways-Dixon y Lainson (1966).

Al analizar la susceptibilidad a la infección, sería interesante ver cómo la toma de azúcares en el laboratorio introduce microorganismos al intestino de los flebótomos, que podrían ser dañinos para la Leishmania, afectando así los porcentajes de infección experimental. Los resultados parecen indicar (p. 17) algún efecto de las bacterias y hongos sobre el establecimiento de la Leishmania.

E. Desarrollo y estado infectivo del parásito en el vector

La infección e invasión de la faringe y la cavidad bucal en los flebótomos no son por sí mismas suficientes para asegurar la transmisión por picadura. Es necesario también que los flagelados desciendan a una posición suficientemente distal en la proboscis (Adler y Theodor, 1957). No se conocen los factores que influyen en el descenso de los promastigotes a la proboscis.

Tampoco se conoce qué proporción de una población de flebótomos de una especie vector desarrolla infecciones en la proboscis en la naturaleza y por lo tanto se vuelve capaz de transmitir el parásito en tomas de sangre subsecuentes. Puede ser que en los trabajos experimentales la proporción sea baja debido a las diferencias individuales con bases genéticas y a las diferencias entre las condiciones naturales y las experimentales, que deben afectar no sólo el

establecimiento de la infección sino también el descenso de los promastigotes en la proboscis. Esto explicaría, en parte, por qué a pesar de que tres insectos infectados en la parte anterior del intestino picaron por segunda vez, no transmitieron la infección al hamster.

Recientemente, Sacks y Perkins (1984) demostraron el desarrollo secuencial de los promastigotes de Leishmania de un estado no infectivo a uno infectivo, en cultivo y en flebótomos. Encontraron que la generación del estado infectivo depende del ciclo de crecimiento y está restringido a organismos que no se encuentran en división, esto es, que están en la etapa estacionaria. En sus experimentos con Lu. anthophora y L. tropica observaron que los promastigotes obtenidos tres días después de la toma de sangre infectiva, cuando todavía había sangre presente en el intestino, eran esencialmente avirulentos en ratones. Mientras que los promastigotes obtenidos de siete a 10 días después de la inoculación del flebótomo eran altamente virulentos. Se piensa que la generación del estado infectivo en el intestino medio, al séptimo día, se debe a que la digestión y el paso de la sangre crea un medio ambiente sin nutrientes, semejante al que se encuentra en los cultivos estacionarios. De tal forma que la diferenciación de los promastigotes a un estado infectivo parece ocurrir en respuesta a condiciones de crecimiento adversas.

El hecho de que exista un estado infectivo en los promastigotes de Leishmania explicaría finalmente por qué en este trabajo no hubo transmisión. De los dos Lu. longipalpis que estaban infectados y que picaron por segunda vez, uno tenía una infección de cuatro días, sin promastigotes en el intestino anterior-medio y con restos de sangre; el otro una de 10 días, con promastigotes en el intestino anterior y también

con restos de sangre. El único Lu. ylephiletor infectado que picó por segunda vez, tenía una infección de siete días, con promastigotes en el intestino anterior-medio y lleno de sangre.

En el Lu. longipalpis con la infección de cuatro días, los promastigotes no se encontraban aún en el estado infectivo. Esto se infiere no sólo por la edad de la infección sino también por la presencia de sangre. En el caso del Lu. longipalpis con la infección de 10 días y en el del Lu. ylephiletor, se esperaría encontrar el estado infectivo de los flagelados de acuerdo a la edad. Sin embargo, aún había sangre presente en ambos casos; las condiciones de crecimiento no se habían vuelto adversas, por lo que podría deducirse que tampoco se había generado el estado infectivo.

V. CONCLUSION

Lu. shannoni y Lu. ylephiletor son altamente susceptibles a la infección con L. mexicana. A pesar de que en este trabajo no se logró la transmisión con estos flebótomos, aparentemente pueden servir como vectores. Ambas especies poseen características que les permitirían transmitir la úlcera del chiclero: su distribución geográfica coincide con la enfermedad, su distribución vertical en el bosque y sus hábitos alimenticios les permitirían el contacto con los reservorios y el hombre y por otro lado, pueden desarrollar infecciones con estos parásitos en el intestino anterior-medio.

En siguientes trabajos sobre la transmisión experimental de L. mexicana por flebótomos, debiera considerarse en forma especial dos aspectos: (1) factores nutricionales especiales en la dieta de los flebótomos, después de la toma de sangre y (2) desarrollo de un estado infectivo de los promastigotes de Leishmania dentro del flebótomo. Recientemente se ha comprobado la importancia de estos dos aspectos. Warburg y Schlein (1986) demostraron que el porcentaje de transmisión es significativamente mayor en las hembras mantenidas con una mezcla de sacarosa y albumina, en la transmisión de L. tropica por Phlebotomus papatasi. Sacks y Perkins (1985) encontraron que tanto para L. major como para L. m. amazonensis, la generación de promastigotes infectivos se da por lo menos tres días después de la comida infectiva, siendo óptima

la infectividad después del paso de la sangre por el intestino medio.

VI. LITERATURA CITADA

Adler, S. y M. Ber. 1941. The transmission of Leishmania tropica by the bite of Phlebotomus papatasi. Indian Journal of Medical Research 29: 803-809.

----- y O. Theodor. 1929. Attempts to transmit Leishmania tropica by bite: the transmission of L. tropica and P. sergenti. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 23:1-16.

----- y ----- . 1957. Transmission of disease agents by phlebotomine sand flies. Annual Review of Entomology 2:203-226.

Anderson, J. R. y S. C. Ayala. 1969. Growth pattern of Leishmania in phlebotomine sandflies. Science 165:1379-1381.

Biagi-F., F. y A. M. de Biagi. 1953. Algunos Flebotomus del área endémica de leishmaniasis tegumentaria americana del Estado de Campeche (Mex.). Medicina (Mex.) 33(679):315-319.

Coelho, M. de V. y A. R. Falcao. 1962. Transmissao experimental de Leishmania braziliensis. II. Transmissao de amostra mexicana por picada de Phlebotomus longipalpis e de Phlebotomus renei. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo 4:220-224.

- Christensen, H. A. y A. Herrer. 1980. Development of a panamanian strain of Leishmania mexicana in co-indigenous Lutzomyia sanguinaria and Lu. gomezi (Diptera: Psychodidae). Journal of Medical Entomology 2:188- 189.
- Disney, R. H.. 1968. Observations on a zoonosis: Leishmaniasis in British Honduras. Journal of Applied Ecology 5:1-59.
- Faust, E. C., P. F. Russell y R. F. Jung. 1974. Craig y Faust, Parasitología Clínica. Salvat Editores S.A., Barcelona. 888 p.
- García-Salazar, J. C. 1973. La leishmaniasis en el departamento de El Petén. Trabajo de tesis para optar al grado de Médico y Cirujano, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de San Carlos de Guatemala. 61 p.
- Garnham, P. C.. 1962. Cutaneous leishmaniasis in the New World, with special reference to Lieshmania mexicana. Science Report Supplement of Sanita 2:76-82.
- Godoy-Monroy, E. 1961. Contribución al estudio de la leishmaniosis en Guatemala. Trabajo de tesis para optar al grado de Médico y Cirujano, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de San Carlos de Guatemala. 41 p.
- Hertig, M., P. T. Johnson y E. McConnell. 1969. Growth pattern of Leishmania in phlebotomine sandflies. Science 165:1379-1380.

- Johnson, P. T. y M. Hertig. 1970. Behavior of Leishmania in Panamanian phlebotomine sandflies fed on infected animals. *Experimental Parasitology* 27:281-300.
- Killick-Kendrick, R., A. J. Leaney, P. D. Ready y D. H. Molyneux. 1977. Leishmania in phlebotomid sandflies. IV. The transmission of Leishmania mexicana amazonensis to hamsters by bite of experimentally infected Lutzomyia longipalpis. *Proceedings of the Royal Society of London B.* 196:105-115.
- Iainson, R. y J. J. Shaw. 1972. Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems. *British Medical Bulletin* 28(1):44-48.
- and B. A. Southgate. 1965. Mechanical transmission of Leishmania mexicana by Stomoxys calcitrans. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 59:716.
- , R. D. Ward y J. J. Shaw. 1977. Leishmania in phlebotomid sandflies. VI. Importance of hindgut development in distinguishing between parasites of the Leishmania mexicana and L. braziliensis complexes. *Proceedings of the Royal Society of London B.* 199:309-320.
- Lewis, D. J.. 1971. Phlebotomid sandflies. *Bulletin of the World Health Organization* 44:535-551.

- . 1974. The biology of Phlebotomidae in relation to leishmaniasis. Annual Review of Entomology 19:363-384.
- y C. R. Donney. 1966. Sugar meals in Phlebotominae and Simuliidae (Diptera). Proceedings of the Royal Entomology Society of London 41: 175-179.
- , D. G. Young, G. B. Fairchild y D. M. Minter. 1977. Proposals for a stable classification of the phlebotimine sandflies (Diptera: Psychodidae). Systematic Entomology 2:319-332.
- Napier, L. E., R. O. A. Smith y K. V. Krishnan. 1933. The transmission of kala-azar to hamsters by bite of the sandfly Phlebotomus argentipes. Indian Journal of Medical Research 21:299-304.
- Padilla-Bolaños, E. 1928. Contribución al estudio de la leishmaniasis forestal americana en Guatemala. Trabajo de tesis para optar al grado de Médico y Cirujano, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Pérez-Guisasola, R.. 1945 Diagnóstico de la leishmaniosis con la cutireacción de Montenegro. Trabajo de tesis para optar al grado de Médico y Cirujano, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de San Carlos de Guatemala. 36 p.
- Sacks, D. L. y P. V. Perkins. 1984. Identification of an infective stage of Leishmania promastigotes. Science 223:1417-1419.

- Sacks, D. L. y P. V. Perkins. 1985. Development of infective stage Leishmania promastigotes within phlebotomine sand flies. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 34(3):456-459.
- Seidelin, H.. 1912. Leishmaniasis and babesiasis in Yucatán. Yellow Fever British Bulletin 2:211-215 and Annals of Tropical Medicine and Parasitology 6:295-237.
- Shortt, H. E., A. C. Craighead y C. S. Swaminath. 1928. A brief resume of recent kala-azar research with special reference to India. Indian Journal of Medical Research 16:221-237.
- , R. O. A. Smith, C. S. Swaminath y K. V. Krishnan. 1931. Transmission of Indian kala-azar by bite of Phlebotomus argentipes. Indian Journal of Medical Reserach 18:1373-1375.
- Smith, R. O. A., K. C. Halder y I. Ahmed. 1940. Further investigations on the transmission of kala-azar. III. The transmission of kala-azar by the bite of the sandfly P. argentipes. Indian Journal of Medical Research 28:585-591.
- , ----- y ----- . 1941. Further investigations on the transmission of kala-azar. IV. A second series of transmissions of L. donovani by P. argentipes. Indian Journal of Medical Research 29:799-802.

- , C. Lal, S. Mukerjee y K. C. Halder. 1936. The transmission of L. donovani by the bite of the sandfly P. argentipes. Indian Journal of Medical Research 24:313-316.
- Strangways-Dixon, J. y R. Lainson. 1962. Dermal leishmaniasis in British Honduras: transmission of L. braziliensis by Phlebotomus species. British Medical Journal 1:297-299.
- y ----- . 1966. The epidemiology of dermal leishmaniasis in British Honduras. III. The transmission of Leishmania mexicana to man by Phlebotomus pessoanus, with observations on the development of the parasite in different species of Phlebotomus. Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 60:192-201.
- Swaminath, C. S., H. E. Shortt y L. A. P. Anderson. 1942. Transmission of Indian kala-azar to man by the bites of Phlebotomus argentipes. Indian Journal of Medical Research 30:473-477.
- Torres-Orellana, L. R.. 1980. Incidencia de Leishmaniasis y su tratamiento en los últimos cinco años. Trabajo de tesis para optar al grado de Médico y Cirujano, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de San Carlos de Guatemala. 38 p.
- Warburg, A. and Y. Schlein. 1986. The effect of post-bloodmeal nutrition of Phlebotomus papatasi on the transmission of Leishmania major. Journal of Tropical Medicine and Hygiene 35(5):926-930.

- Ward, R. D., R. Lainson y J. J. Shaw. 1977. Experimental transmissions of Leishmania mexicana amazonensis (Lainson & Shaw), between hamsters by bite of Lutzomyia flaviscutellata (Mangabeira). Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 71(3):365-372.
- Williams, P.. 1966. Experimental transmission of Leishmania mexicana by Lutzomyia cruciata. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 60 (3):365-372.
- . 1970. Phlebotomine sandflies and leishmaniasis in British Honduras (Belize). Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 64:317-368.
- World Health Organization, Expert Committee. 1984. The leishmaniasis. World Health Organization Technical Report Series 701, 108p.
- Young, D. G.. 1979. A review of the bloodsucking psychodid flies of Colombia (Diptera: Phlebotominae and Sycoracinae). University of Florida Agriculture Experimental Station Technical Bulletin 806, 266p.
- Zuckerman, A. and R. Lainson. 1977. Leishmania, p. 57-133. In J. P. Kreier. Parasitic protozoa. Academic Press, New York. 4 vol.