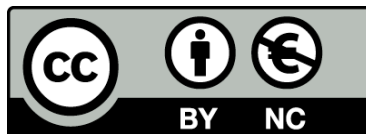




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Epidemiología de la leishmaniosis tegumentaria en el municipio Quilombo, oeste del estado de Santa Catarina, Brasil

Maria Assunta Busato



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0. Spain License.**



Divisió de Ciències de la Salut

Facultat de Farmàcia

DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGIA I PARASITOLOGIA SANITÀRIES
Laboratori de Parasitologia

TESIS

**EPIDEMIOLOGÍA DE LA LEISHMANIOSIS TEGUMENTARIA EN EL
MUNICIPIO DE QUILOMBO, OESTE DEL ESTADO DE SANTA
CATARINA - BRASIL**

Por

Maria Assunta Busato

Directoras: Dra. Montserrat Portús Vinyeta

Dra. Montserrat Gállego Culleré

Barcelona, 2001

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0701098677

UNIVERSITAT DE BARCELONA
DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGIA I PARASITOLOGIA SANITÀRIES

Programa de doctorado: MICROBIOLOGIA I PARASITOLOGIA CLÍNQUES
(1997-1999)

**Título de la Tesis: EPIDEMIOLOGÍA DE LA LEISHMANIOSIS TEGUMENTARIA EN
EL MUNICIPIO DE QUILOMBO, OESTE DEL ESTADO DE
SANTA CATARINA – BRASIL**

Presentada por: MARIA ASSUNTA BUSATO

Para optar al grado de Doctor en Biología por la Facultat de Biologia

Co-Directoras de la Tesis: Dra. Montserrat Portús Vinyeta


Catedrática de Parasitología del Departament de Microbiologia i
Parasitologia Sanitàries de la Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona

Dra. Montserrat Gállego Culleré

Profesora Titular del Departament de Microbiologia i
Parasitologia Sanitàries de la Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona


Autorizan su presentación:

Las directoras:

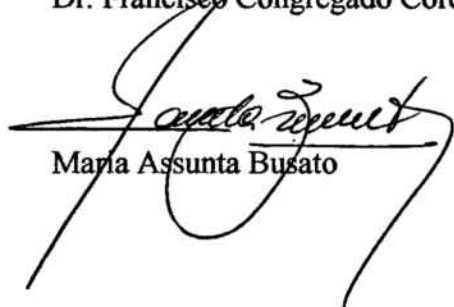

Dra. Montserrat Portús Vinyeta


Dra. Montserrat Gállego Culleré

El Director del Departamento:


Dr. Francisco Congregado Córdoba

La Interessada:


Maria Assunta Busato

La experiencia de haber vivido más de tres años en un país europeo para hacer esta tesis, es como haber hecho otra tesis, por todo lo que he aprendido al convivir día tras día con tantas cosas distintas, empezando por el idioma. Esto exige una adaptación que no es fácil pero es una situación que enriquece mucho. La decisión de realizar esta tesis implicó optar por una dedicación personal muy intensa e inversiones económicas que posiblemente no serán restituidas pero fue válida, más que todo, por la realización personal y por la satisfacción de que podré socializar los conocimientos adquiridos.

Con la colaboración de algunas instituciones y de muchas personas esta tesis ha podido ser finalizada, por lo que aquí quiero registrar mis agradecimientos:

En primero lugar, no tengo palabras para agradecer a mis directoras de tesis, Montserrat Portús y Montserrat Gállego, Catedrática y Profesora Titular, respectivamente, del Departament de Microbiologia i Parasitologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona, por la dedicación y colaboración directa en la elaboración de esta tesis, tanto en el trabajo de campo realizado en Brasil como la constante orientación, críticas y enseñanza en todas las fases de este estudio. Agradezco también su amistad y la amable acogida. Como extranjera, sentí que muchas veces me habéis dado la mano. Les estaré eternamente agradecida por todo.

A la Dra. Cristina Riera, Profesora Titular del Departament de Microbiologia i Parasitologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona por toda la colaboración que me fue dedicada durante la realización de este estudio, especialmente en la serología. Gracias por el apoyo que me has dado y que siempre conserves tu agradable sonrisa. A Jaume Carrió, que siempre estuvo disponible para oír las dudas y por haber colaborado tantas veces en las cuestiones de informática, miles de gracias. Indistintamente, a todas las compañeras del equipo de leishmaniosis del Laboratorio de Parasitología, Soledad Castillejo, Silvia Tebar, Laura Iniesta, Roser Fisa y Susana Calle, por todos los momentos, trabajos y discusiones compartidas. La amistad de todas vosotras hizo que mi estancia en la Universidad fuera muy grata.

De forma general a todos los profesores y funcionarios de Laboratorio del Parasitología de la Facultat de Farmàcia, por el cariño con que siempre me han tratado.

A la Universitat de Barcelona por haberme aceptado para la realización de la tesis doctoral, permitiendo desarrollar el trabajo en sus laboratorios.

De forma muy especial mis agradecimientos a la Universidade do Oeste de Santa Catarina – Campus de Chapecó, por el aporte económico y la confianza depositada permitiendo que me ausentase por todo este tiempo. También mi gratitud a todos los amigos de esa Institución, en especial los del Centro de Saúde por su incentivo y apoyo.

A todas las personas del municipio de Quilombo que participaron de este estudio y por haber permitido tantas veces estar en sus domicilios, durante la realización de las actividades de este trabajo. De la misma forma, a los funcionarios de la Prefeitura Municipal de Quilombo que fueron incansables en sus colaboraciones. Quiero agradecer, también, a los funcionarios del banco de sangre de Chapecó, así como a los laboratorios Bio-Manguinhos de la Fundação Oswaldo Cruz y CPPI-Paraná por ceder la leishmanina.

De forma muy cariñosa a mis eternos amigos Luiz Pimentel, Simone Raszl y Silvana Winckler, mi gratitud por toda la ayuda. De modo muy especial, mi tierno agradecimiento a José Antonio Estévez, por su amistad y calurosa acogida y, de todo, todo mi corazón a Alain Hidoine.

À minha família que por tanto tempo me viu em terras tão distantes, do outro lado do Atlântico, quero pedir desculpas pela ausencia, especialmente nos momentos mais difíceis como quando da perda do Felipe. Sei que a saudade corroe o coração de todos, mas tivemos razões e forças para superar. Obrigada pelo amor, compreensão e apoio.

	Índice
	Pág.
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. EL PARÁSITO.....	2
I.1.1. Taxonomía del género <i>Leishmania</i>	2
I.1.2. Ciclo biológico del parásito	5
I.1.2.1. Ciclo biológico en el vector	5
I.1.2.2. Ciclo biológico en el vertebrado.....	5
I.2. EL VECTOR.....	6
I.2.1. Morfología y biología de los flebotominos.....	8
I.2.1.1. Huevos.....	8
I.2.1.2. Larvas.....	8
I.2.1.3. Pupas.....	9
I.2.1.4. Adultos.....	9
I.2.2. El vector en el Nuevo Mundo.....	11
I.2.3. El vector en Brasil.....	11
I.3. EL RESERVORIO.....	12
I.3.1. El reservorio en el Nuevo Mundo.....	13
I.3.2. El reservorio en Brasil.....	13
I.4. CICLO EPIDEMIOLÓGICO Y FORMAS DE TRANSMISIÓN.....	15
I.5. FORMAS CLÍNICAS.....	16
I.5.1. Leishmaniosis Tegumentaria Americana (LTA).....	16
I.5.1.1. Leishmaniosis cutánea.....	16
I.5.1.2. Leishmaniosis mucocutánea.....	17
I.5.1.3. Leishmaniosis cutánea difusa.....	17
I.5.2. Leishmaniosis visceral.....	18
I.6. DIAGNÓSTICO.....	18
I.7. TRATAMIENTO.....	19
I.8. LEISHMANIOSIS EN BRASIL.....	20
II. JUSTIFICACIÓN, OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	22
II.1. PLAN DE TRABAJO.....	23
III. ZONA DE ESTUDIO.....	25
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	31
IV.1. ESTUDIO CON LA POBLACIÓN HUMANA.....	31

IV.1.1. Análisis de sueros del banco de sangre de Chapecó.....	31
IV.1.2. Estudio de la leishmaniosis en la población humana de Quilombo.....	32
IV.2. ESTUDIO CON LA POBLACIÓN CANINA.....	33
IV.3. OTROS ANIMALES POSIBLES RESERVORIOS.....	34
IV.4. ESTUDIO CON LA POBLACIÓN DE FLEBOTOMINOS.....	34
IV.5. RECOGIDA DE MUESTRAS.....	36
IV.5.1. Muestras de sangre.....	36
IV.5.1.1 Humana.....	36
IV.5.1.2. Canina.....	37
IV.5.1.3. Otros hospedadores.....	37
IV.5.2. Muestras para cultivo.....	37
IV.5.2.1. Punción ganglionar (ganglio poplíteo).....	37
IV.5.2.2. Aspirado cutáneo.....	38
IV.6. TRAMPAS UTILIZADAS.....	38
IV.6.1. Para captura de flebotominos.....	38
IV.6.1.1. Trampas de papel adhesivo.....	38
IV.6.1.2. Captura con trampas luminosas tipo CDC.....	39
IV.6.1.3. Trampas Shannon.....	39
IV.6.2. Captura de roedores y animales silvestres.....	39
IV.7. TÉCNICAS UTILIZADAS.....	40
IV.7.1. EL ELISA.....	40
IV.7.1.1. El antígeno.....	40
IV.7.1.2. Preparación del antígeno.....	41
IV.7.1.3. Sensibilización de la placa de poliestireno.....	41
IV.7.1.4. Adición de las muestras.....	41
a) ELISA a partir del suero.....	41
b) ELISA a partir de papel de filtro.....	42
IV.7.1.5. Adición de conjugado enzimático.....	42
IV.7.1.6. Adición del substrato.....	43
IV.7.1.7. Lectura.....	43
IV.7.1.8. Valoración de los resultados.....	43
IV.7.2. El <i>Western Blot</i>	44

IV.7.2.1. Preparación del antígeno.....	44
IV.7.2.2. Preparación de los geles de poliacrilamida.....	44
IV.7.2.3. Electroforesis.....	45
IV.7.2.4. Transferencia para las membranas de nitrocelulosa..	45
IV.7.2.5. Inmunoblot.....	46
IV.7.2.6. Determinación del peso molecular de las bandas	46
IV.7.3. Análisis parasitológico.....	46
IV.7.4. Test de hipersensibilidad retardada o intradermoreacción de Montenegro (IDR).....	47
IV.7.5. Recogida y montaje de los flebotominos.....	47
V. RESULTADOS.....	48
V.1. ESTUDIO DE LOS SUEROS DEL BANCO DE SANGRE DE CHAPECÓ	48
V.1.1. Resultados obtenidos con ELISA.....	48
V.1.2. Resultados obtenidos en <i>Western Blot</i>	50
V.2. ESTUDIO DE LA LEISHMANIOSIS EN LA POBLACIÓN HUMANA DE QUILOMBO.....	53
V.2.1. Test de la intradermoreacción de Montenegro (IDR).....	53
V.2.1.1. Descripción de la población estudiada	53
V.2.1.2. Resultados globales de la IDR.....	53
V.2.1.3. Resultados según el sexo y la edad.....	55
V.2.1.4. Desplazamientos a zonas endémicas.....	58
V.2.1.5. Distribución de la positividad por localidad.....	58
V.2.2. Resultados obtenidos con ELISA.....	60
V.2.2.1. Sexo.....	60
V.2.2.2. Edad.....	60
V.2.2.3. Localidad	61
V.2.3. El <i>Western Blot</i>	62
V.3. EL RESERVORIO.....	64
V.3.1. Estudio con la población canina.....	64
V.3.1.1. Diagnóstico parasitológico.....	64
V.3.1.2. Diagnóstico serológico.....	65
a) El ELISA.....	65
b) El <i>Western Blot</i>	66

V.3.1.3. Distribución de anticuerpos anti- <i>Leishmania</i> en función de las características de la población canina estudiada.	66
a) Patología.....	66
b) Sexo.....	66
c) Edad.....	67
d) Tamaño y peso.....	68
e) Longitud del pelo.....	69
f) Seroprevalencia de la leishmaniosis canina distribuida por localidad.....	70
V.3.2. Análisis en otros hospedadores.....	71
V. 4. EL VECTOR.....	73
V. 4.1. Resultados globales.....	73
V.4.1.1. Estudio cualitativo: riqueza específica.....	73
V.4.1.2. Estudio cuantitativo.....	74
V.4.1.3. Resultados obtenidos con cada tipo de trampa.....	75
a) Papel adhesivo.....	75
b) CDC.....	76
c) Shannon	77
V.4.1.4. Resultados globales obtenidos en cada localidad.....	77
V. 4.2. Estacionalidad	80
V.4.2.1. Capturas realizadas en la primera etapa (enero y febrero/99).....	80
V.4.2.2. Capturas realizadas en la segunda etapa (octubre/99 a febrero/00).....	83
a) Capturas realizadas en noviembre/99 y en enero/00 en cada localidad.....	86
b) Capturas realizadas de octubre/99 a febrero/00.....	89
V.4.3. Fenología.....	91
V.4.3.1. Porcentaje de machos.....	91
a) <i>Lu. neivai</i>	91
b) <i>Lu. migonei</i>	93
V.4.3.2. Estudio de las hembras	94
a) <i>Lu. neivai</i>	94

	Índice
b) <i>Lu. migonei</i>	94
V.4.3.3. Estudio del ciclo nictemeral.....	97
VI. DISCUSIÓN	100
VI.1. ANÁLISIS DE LOS SUEROS DEL BANCO DE SANGRE DEL HOSPITAL REGIONAL DE CHAPECÓ.....	100
VI.2. ESTUDIO DE LA LEISHMANIOSIS EN LA POBLACIÓN HUMANA DE QUILOMBO.....	105
VI.2.1. Estudio de la población utilizando el test de Intradermorreacción de Montenegro.....	105
VI.2.2. Análisis realizados a través de ELISA.....	110
VI.3. EL RESERVORIO.....	111
VI.3.1. El perro.....	111
VI.3.2. Análisis con otros posibles reservorios.....	115
VI.4. EL VECTOR	116
VI.4.1. Trampas utilizadas para la captura de flebotominos: Su rendimiento.....	116
VI.4.2. Flebotominos encontrados en esta zona de estudio.....	118
VI.4.3. Períodos de captura.....	124
VI.4.4. Estudio fenológico.....	125
VI.4.5. Ciclo nictemeral.....	128
VI.5. CONSIDERACIONES FINALES.....	129
VII. CONCLUSIONES	134
VIII. BIBLIOGRAFIA	136
IX. ANEXOS	
ANEXO 1. Reactivos empleados en las diferentes técnicas realizadas.....	160
ANEXO 2. Relación de los sueros del banco de sangre de Chapecó, sus municipios de procedencia y los respectivos resultados de la serología: ELISA y <i>Western Blot</i>	163
ANEXO 3. Resultados individualizados obtenidos en los estudios realizados con la población humana de Quilombo: IDR y ELISA.....	177
ANEXO 4. Resultados individualizados del estudio con los perros: ELISA y cultivos.....	186

ANEXO 5. Relación de muestras de sangre de <i>Didelphis albiventris</i> y <i>Rattus rattus</i> y los respectivos resultados de la serología ELISA.....	192
ANEXO 6. Termo de Consentimento e Informação.....	193

ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

1 – Localización geográfica de la zona de estudio.....	26
2 – Temperatura media anual de Santa Catarina con señalización de la región oeste	27
3 – Precipitación media anual de Santa Catarina con señalización de la región oeste	28
4 – Humedad relativa del aire de Santa Catarina con señalización de la región oeste	29
5 – Localización de algunos de los municipios de procedencia de los donantes del banco de sangre de Chapecó.....	31
6 – Mapa de Quilombo indicando los lugares de estudio con humanos, animales y flebotominos.....	36
7 – Trampas utilizadas para captura de flebotominos.....	38
8 – Trampa tipo “live-trap” utilizada para la captura de <i>Didelphis</i>	40
9 – Títulos de anticuerpos específicos de <i>Leishmania</i> en los sueros humanos estudiados procedentes del banco de sangre de Chapecó.....	49
10 – Relación entre la positividad del ELISA y el número de bandas reveladas en <i>Western Blot</i>	52
11 – Histograma de frecuencias de la medida de las reacciones obtenidas en el test de hipersensibilidad retardada.....	55
12 – Distribución de la población estudiada mediante IDR y número de personas positivas en cada grupo de edad.....	56
13 – Relación entre la edad de la población y la positividad de la IDR en su aspecto cuantitativo y cualitativo.....	57
14 – Positividad según el sexo en cada grupo de edad.....	57
15 – Positividad frente al antígeno de Montenegro obtenida en cada localidad.....	59
16 – Intensidad de la IDR obtenida en cada localidad	59
17 – Resultados de los títulos de anticuerpos específicos obtenidos frente al antígeno de <i>Leishmania</i> en los distintos grupos de edad.....	61
18 – Resultados de los títulos de anticuerpos específicos obtenidos frente al antígeno de <i>Leishmania</i> en cada localidad.....	61
19 – Relación entre la medida de la IDR y las Unidades obtenidas en ELISA.....	62
20 – Signos clínicos de leishmaniosis. Lesiones cutáneas y onicogriposis en un perro	

con serología positiva del municipio de Quilombo.....	64
21 – Resultados obtenidos en el conjunto de perros analizados a través de ELISA.....	65
22 – Seroprevalencia según el sexo en la población canina.....	67
23 – Seroprevalencia según los grupos de edad de la población canina.....	67
24 – Relación entre la edad de los animales y la positividad en su aspecto cuantitativo y cualitativo.....	68
25 – Seroprevalencia según el tamaño y peso del animal.....	69
26 – Seroprevalencia según el tipo de pelaje del animal.....	70
27 – Distribución, por localidad, de la seroprevalencia de la leishmaniosis canina.....	70
28 – Mapa del municipio de Quilombo indicando las localidades y los respectivos resultados de la seropositividad de los perros.....	71
29 – <i>Didelphis albiventris</i> capturado en Chapecó.....	72
30 – N° de flebotominos y porcentaje de machos de <i>Lu. neivai</i> capturados en Janeiro y Zamignan.....	92
31 – N° de flebotominos y porcentaje de machos de <i>Lu. neivai</i> capturados en Janeiro..	92
32 – N° de flebotominos y porcentaje de machos de <i>Lu. neivai</i> capturados en Zamignan.....	92
33 – N° de flebotominos y porcentaje de machos de <i>Lu. migonei</i> capturados en Janeiro y Zamignan.....	93
34 – N° de flebotominos y porcentaje de machos de <i>Lu. migonei</i> capturados en Janeiro.....	93
35 – N° de flebotominos y porcentaje de machos de <i>Lu. migonei</i> capturados en Zamignan.....	93
36 – N° de hembras y porcentaje de hembras grávidas, o con sangre, de <i>Lu. neivai</i> capturadas en Janeiro y Zamignan.....	95
37 – N° de hembras y porcentaje de hembras grávidas, o con sangre, de <i>Lu. neivai</i> capturadas en Janeiro	95
38 – N° de hembras y porcentaje de hembras grávidas, o con sangre, de <i>Lu. neivai</i> capturadas en Zamignan.....	95
39 – N° de hembras y porcentaje de hembras grávidas, o con sangre, de <i>Lu. migonei</i> capturadas en Janeiro y Zamignan.....	96
40 – N° de hembras y porcentaje de hembras grávidas, o con sangre, de <i>Lu. migonei</i> capturadas en Janeiro	96

41 – Nº de hembras y porcentaje de hembras grávidas, o con sangre, de <i>Lu. migonei</i> capturadas en Zamignan.....	96
42 – Ciclo nictemeral 1, noche de 30-31/01/00: Capturas y temperatura.....	99
43 – Ciclo nictemeral 2, noche de 05-06/02/00: Capturas y temperatura.....	99
44 – Ciclo nictemeral 3, noche de 10-11/02/00: Capturas y temperatura.....	99
45 – Localización geográfica de los estados que comprenden la región sur de Brasil y la zona de Argentina que hace límite o que está cercana a estos estados.....	119
46 – Relación de la temperatura y pluviometría, demostrados a través de la curva de Gausson y Banyuls, indicando períodos secos y húmedos.....	125
47 – Relación de la presencia de flebotominos con la temperatura y pluviometría registrados de octubre/1999 a febrero/2000.....	126
48 – Relación de la presencia de <i>Lu. neivai</i> con la temperatura y pluviometría registrados de octubre/1999 a febrero/2000.....	126
49 – Relación de la presencia de <i>Lu. migonei</i> con la temperatura y pluviometría registrados de octubre/1999 a febrero/2000.....	127

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
1 – Especie de <i>Lutzomyia</i> , parásito que transmite, tipo de leishmaniosis y las principales zonas endémicas.....	11
2 – Especies de <i>Lutzomyia</i> consideradas vectoras de <i>Leishmania</i> en Brasil y el respectivo parásito que transmiten.....	12
3 – Reservorios de <i>Leishmania</i> en Brasil	14
4 – Reactividad de la proteína A frente a las IgG de diferentes especies animales	43
5 – Distribución, por municipio, de los sueros del banco de sangre de Chapecó que presentaron anticuerpos específicos frente a <i>Leishmania</i>	50
6 – Distribución, por municipio, del número de sueros y su respectivo número de bandas obtenidas en <i>Western Blot</i>	51
7 – Resultados de la IDR según el sexo de la población estudiada.....	55
8 – Resultados de la IDR según desplazamiento a zonas endémicas.....	58
9 – Media aritmética de los títulos de anticuerpos específicos obtenidos frente al antígeno de <i>Leishmania</i>	60
10 – Seroprevalencia según la presencia de signos clínicos indicativos de leishmaniosis.....	66
11 – Seroprevalencia según el sexo y los grupos de edad.....	68
12 – Seroprevalencia según el peso y el tamaño de la población canina.....	69
13 – Seroprevalencia según la longitud del pelo en la población canina.....	69
14 – Totalidad de los flebotomos capturados y su distribución por especie y sexo.....	74
15 – Número, abundancia y frecuencia de los flebotomos capturados en el municipio de Quilombo.....	75
16 – Abundancia, frecuencia, densidad y porcentaje de machos capturados con trampas de papel adhesivo en el municipio de Quilombo.....	76
17 – Abundancia, frecuencia y el número de ejemplares por trampa (CDC) de flebotominos capturados en el municipio de Quilombo.....	76
18 – Presencia de flebotominos en las distintas localidades capturados con papel adhesivo.....	78
19 – Presencia de flebotominos en las distintas localidades capturados con trampas CDC.....	78
20 – Abundancia de las especies de flebotominos encontrados en cada localidad(CDC)	79

21 – Número de flebotominos/trampa encontrados en cada localidad (CDC).....	79
22 – Presencia de flebotominos en las distintas localidades capturados con trampas de papel adhesivo.....	81
23 – Presencia de flebotominos en las distintas localidades capturados con trampas CDC.....	81
24 – Resultados de las capturas realizadas en la primera etapa con trampas de papel adhesivo y CDC (enero y febrero de 1999).....	81
25 – Abundancia de flebotominos capturados en el periodo de enero y febrero/99, en cada una de las localidades.....	82
26 – Número de flebotominos/trampa, capturados en la primera etapa, en cada una de las localidades.....	82
27 – Resultados globales de las capturas efectuadas en la segunda etapa (octubre/99 a febrero/00).....	83
28 – Presencia de flebotominos en las distintas localidades capturados con trampas de papel adhesivo (octubre/99 a febrero/00).....	85
29 – Presencia de flebotominos en las distintas localidades capturados con trampas CDC (octubre/99 a febrero/00).....	85
30 – Abundancia de flebotominos capturados en noviembre/99 en las distintas localidades del municipio de Quilombo.....	87
31 – Abundancia de flebotominos capturados en enero/00 en las distintas localidades del municipio de Quilombo.....	87
32 – Número de flebotominos por trampa capturados en noviembre/99 en las distintas localidades.....	88
33 – Número de flebotominos/ trampa capturados en enero/00 en las distintas localidades.....	88
34 – Abundancia de flebotominos capturados en las localidades de Janeiro y Zamignan, en el seguimiento de octubre/99 a febrero/00.....	90
35 – Número de flebotominos/trampa capturados en las localidades de Janeiro y Zamignan, en el seguimiento de octubre/99 a febrero/00.....	90
36 – Distribución de las especies, número de ejemplares y horarios de captura en el ciclo nictemeral 1.....	97
37 – Distribución de las especies, número de ejemplares y horarios de captura en el ciclo nictemeral 2.....	98

38 – Distribución de las especies, número de ejemplares y horarios de captura en el ciclo nictemeral 3.....	98
39 – Riqueza específica de flebotominos de la región sur de Brasil y la zona de Argentina que hace límite o que está cerca a estos estados.....	120
40 – Relación de las localidades estudiadas con los respectivos resultados obtenidos en los análisis de intradermorreacción de Montenegro en personas, serología en perros y capturas de flebotominos.....	132

ÍNDICE DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

- ADN – Ácido desoxirribonucleico
- B.* – *Brumptomyia*
- CDC – Center of Disease Control
- DO – Densidad Óptica
- ELISA – Enzyme-linked Immunosorbent Assay
- EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuaria e Extensão Rural de Santa Catarina
- IDR – Intradermorreacción de Montenegro
- IFI – Inmunofluorescencia indirecta
- IFN – Interferon
- Ig – Inmunoglobulina
- Ja – Janeiro
- kD – kiloDalton
- L.* – *Leishmania*
- LTA – Leishmaniosis Tegumentaria Americana
- Lu.* – *Lutzomyia*
- MS/FUNASA – Ministerio de Saúde/Função Nacional de Saúde
- NC – Nitrocelulosa
- NNN – Novy McNeal Nicolle
- OMS – Organización Mundial de la Salud
- OPD – Orto-fenilendiamina dihidroclorhidrato
- OPS – Organización Panamericana de la Salud
- P.* – *Phlebotomus*
- PAGE – Electroforesis en gel de poliacrilamida
- PBS – Tampón fosfato
- PBS-T-L - Tampón fosfato tween leche
- PCR - Reacción en cadena de la polimerasa
- r.p.m. – revoluciones por minuto
- R_f – movilidad relativa
- SDS – Lauril sulfato sódico
- SC – Santa Catarina

TS – Tris Salino

TST – Tris Salino Tween

U – Unidades en ELISA

UI – Unidades Internacionales

UNOESC – Universidade do Oeste de Santa Catarina

V. – Viannia

WHO – World Health Organization

Za - Zamignan

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

Se designa como leishmaniosis a un conjunto de parasitosis producidas por protozoos flagelados del género *Leishmania* Ross, 1903. Estos parásitos presentan un ciclo heteroxeno en que dípteros flebotominos actúan como hospedadores invertebrados y vectores y diversos mamíferos sirven como hospedadores vertebrados.

Debido a la gran prevalencia de la leishmaniosis en algunas zonas tropicales, la Organización Mundial de la Salud la incluyó, en 1977, en su Programa Especial de Investigación y Enseñanza sobre Enfermedades, junto a otras enfermedades como la malaria y la lepra.

Se presenta bajo diferentes formas clínicas: cutáneas, mucocutáneas y viscerales variando mucho su aspecto. Existen al menos veinte especies de *Leishmania* patógenas que son transmitidas por la picadura de flebotominos (Desjeux, 1996; WHO, 1998; Ashford, 2000).

En el mundo hay cerca de 88 países afectados por esta enfermedad con una prevalencia de 12 millones de casos. La población de riesgo está estimada en 350 millones de personas y la incidencia anual es de 1,5 a 2 millones de casos de leishmaniosis cutánea y 500 mil de visceral (Ashford y col., 1992; WHO, 2000).

La distribución geográfica de esta parasitosis está limitada por la distribución de los flebotominos, su susceptibilidad a los climas fríos, su tendencia de ingerir sangre del hombre o de animales y la capacidad de desarrollar el parásito en su interior.

En América del Sur y Central, la leishmaniosis es endémica en áreas que están situadas en regiones semiáridas (Nunes y col., 1988). La forma visceral está presente en gran parte de la región Neotropical de las Américas (Deane, 1958; Tolezano y col., 1980). Las formas cutánea y mucocutánea están presentes desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina (OPS, 1996). Los límites conocidos de su área de distribución son las latitudes de cerca de 19° N y 29° S (Deane, 1958). En el Nuevo Mundo no hay casos notificados en los países de Canadá, Chile, Uruguay y las islas del Caribe.

En las zonas donde la leishmaniosis es endémica, la distribución consiste en diferentes focos, a menudo separados unos de los otros por barreras zoogeográficas. Las condiciones ambientales del foco crean unos componentes (vectores y reservorios) específicos para cada uno de ellos (Ashford y Bettini, 1987). Otros factores como la temperatura, la geografía, el tipo de vegetación y la presencia del reservorio, contribuyen para los límites del vector y el parásito.

I.1. EL PARASITO

Las especies del género *Leishmania* son protozoos pertenecientes al Orden **Kinetoplastida** y a la familia **Trypanosomatidae**. Las distintas especies son muy parecidas morfológicamente, motivo por el cual, por mucho tiempo, eran pocas las descritas. Éstos parásitos presentan, fundamentalmente, dos estadios: el *amastigote* y el *promastigote* que se diferencian en su ciclo evolutivo (Killick-Kendrick, 1987).

Amastigote – Es la forma aflagelada y ovalada con cerca de 3 μm de diámetro. El núcleo es grande y ocupa gran parte del cuerpo del parásito. El kinetoplasto se presenta en forma de un pequeño bastón y está entre la extremidad anterior y el núcleo. Vive dentro de las células monocíticas e histiocíticas de los hospedadores vertebrados.

Promastigote – Es flagelado, se presenta como un cuerpo alargado y de flagelo libre que está insertado en la porción anterior del cuerpo, lo cual le da el movimiento. El núcleo es oval o redondeado y está en la porción mediana del cuerpo. El kinetoplasto es una estructura mitocondrial rica en ADN situada entre la extremidad anterior y el núcleo. Esta forma vive extracelularmente en el tracto digestivo del hospedador invertebrado.

I.1.1. Taxonomía del género *Leishmania*

Según Lainson y Shaw (1987), la situación taxonómica de *Leishmania* es:

Reino	PROTISTA
Subreino	PROTOZOA
Phylum	SARCOMASTIGOPHORA
Subphylum	MASTIGOPHORA
Clase	ZOOMASTIGOPHOREA
Orden	KINETOPLASTIDA
Suborden	TRYPANOSOMATINA
Familia	TRYPANOSOMATIDAE Doflein, 1901, emend. Grobben, 1905
Género	<i>Leishmania</i> Ross, 1903

Por mucho tiempo la clasificación del género *Leishmania* estuvo basada en los aspectos clínicos que presentaba la enfermedad. Con la evolución de los conocimientos, otros parámetros fueron introducidos, como sean, los aspectos epidemiológicos, biológicos y la distribución geográfica.

En 1972-1973 Lainson y Shaw propusieron una denominación binomial de los complejos *mexicana* y *braziliensis*, para los parásitos causantes de la Leishmaniosis Tegumentaria Americana (LTA). En 1979, estos autores propusieron agrupar las especies de *Leishmania* basados en la evolución del parásito en el vector:

- Sección hipopilaria – La multiplicación de los promastigotes se limita a las regiones terminales del tubo digestivo;
- Sección peripilaria – La multiplicación de los protmastigotes tiene lugar a lo largo del tubo digestivo del vector;
- Sección suprapilaria – El ciclo reproductivo de los promastigotes sólo se realiza en la región antepilórica del tubo digestivo del flebotomino.

En la sección hipopilaria se agrupan los parásitos de los reptiles, constituyendo el género *Sauroleishmania* (Killick-Kendrick y col., 1986). El género *Leishmania* se dividió en subgénero *Leishmania* para reemplazar el grupo suprapilariano (Safyanova, 1982) y en el subgénero *Viannia*, se agrupan las leishmanias que se desarrollan en la región peripilaria (Lainson y Shaw, 1977).

Hasta entonces los parámetros utilizados no permitían una exequible clasificación de los parásitos. En 1987, Lainson y Shaw propusieron una nueva clasificación que engloba las leishmanias en dos subgéneros: *Leishmania* y *Viannia*.

Actualmente se utilizan otros criterios biológicos, técnicas inmunológicas, bioquímicas y moleculares, especialmente la electroforesis de isoenzimas para la clasificación. El desarrollo de estas nuevas técnicas ha permitido establecer marcadores taxonómicos precisos de las características intrínsecas entre los parásitos. La clasificación basada en el análisis enzimático permitió observar que *L. (L.) amazonensis* no difiere de *L. (L.) garnhami* y que *L. (V.) braziliensis* y *L. (V.) guyanensis* son muy diferentes, razón por la cual esta última es elevada al rango de complejo incluyendo en él *L. (V.) panamensis* (Moreno y col., 1986a). Se

demonstró también que *L. (L.) chagasi* de América Latina no se diferencia de *L. (L.) infantum*, por lo que se consideran sinónimos (Moreno y col., 1986b).

En 1990, Rioux y col. agruparon las especies de *Leishmania* en complejos que están formados por zimodemas íntimamente relacionados. Más recientemente, la clasificación de Rioux y Lanotte (1993) diferencia las siguientes especies (Dedet, 2000):

I – Subgénero *Leishmania* Ross, 1903

Complejo filogenético *L. donovani*

- *L. donovani* (Laveran y Mesnil, 1903)
- *L. archibaldi* Castellani y Chalmers, 1919

Complejo filogenético *L. infantum*

- *L. infantum* Nicolle, 1908 (sin. *L. chagasi* Cunha y Chagas, 1937)

Complejo filogenético *L. tropica*

- *L. tropica* (Wright, 1903)

Complejo filogenético *L. killicki*

- *L. killicki* Rioux, Lanotte y Pratlong, 1986

Complejo filogenético *L. aethiopica*

- *L. aethiopica* Yakimoff y Schokhor, 1914

Complejo filogenético *L. turanica*

- *L. turanica* Strelkova, Peters y Evans, 1990

Complejo filogenético *L. gerbilli*

- *L. gerbilli* Wang, Qu y Guan, 1964

Complejo filogenético *L. arabica*

- *L. arabica* Peters, Elbihari y Evans, 1986

Complejo filogenético *L. mexicana*

- *L. mexicana* Biagi, 1953 (sin. *L. pifanoi* Medina y Romero, 1959)

Complejo filogenético *L. amazonensis*

- *L. amazonensis* Lainson y Shaw, 1972 (sin. *L. garnhami*, Scorza y col., 1979)
- *L. aristidesi* Lainson y Shaw, 1979

Complejo filogenético *L. enriettii*

- *L. enriettii* Muniz y Medina, 1948

Complejo filogenético *L. hertigi*

- *L. hertigi* Herrer, 1971
- *L. deanei* Lainson y Shaw, 1977

II – Subgénero *Viannia* Lainson y Shaw, 1987

Complejo filogenético *L. braziliensis*

- *L. braziliensis* Vianna, 1911
- *L. peruviana* Velez, 1913

Complejo filogenético *L. guyanensis*

- *L. guyanensis* Floch, 1954
- *L. panamensis* Lainson y Shaw, 1972
- *L. shawi* Lainson y col., 1989

Complejo filogenético *L. naiffi*

- *L. naiffi* Lainson y Shaw, 1989

Complejo filogenético *L. lainsoni*

- *L. lainsoni* Silveira y col., 1987

I.1.2. Ciclo biológico del parásito

Los parásitos del género *Leishmania* oscilan entre distintos estadios de desarrollo. En el vector que es la forma promastigote y flagelada que vive en el intestino del insecto, otro en el vertebrado, dentro de los macrófagos, que es la forma amastigote y aflagelada, por lo tanto no es móvil.

I.1.2.1. Ciclo biológico en el vector

Cuando el vector pica el hospedador vertebrado parasitado tomará, junto a la sangre o linfa, los promastigotes que van a evolucionar a la fase amastigota en el interior del tubo digestivo del flebotomino. Se reproducen bajo la fase amastigota y pasan a la fase de promastigota que se multiplica activamente. Finalmente, después de pasar, rápidamente, por la fase de paramastigota (fase flagelada con kintonúcleo al lado del núcleo), que también sufre división binaria, los promastigotes metacíclicos se sitúan en la trompa del vector desde donde pasarán al hospedador vertebrado.

I.1.2.2. Ciclo biológico en el vertebrado

Al picar para la toma de sangre, los promastigotes son inyectados por el vector en la piel del vertebrado. Estos parásitos son captados por los macrófagos donde son englobados por una vacuola parasitófora y allí se multiplican como amastigotes a través de sucesivas divisiones, hasta que la célula hospedadora se rompa y los amastigotes sean liberados y captados por otros macrófagos. Dentro de los macrófagos, sufren la acción de los lisosomas pero los

parásitos resisten y se multiplican hasta *lisar* el macrófago. Los parásitos liberados invaden otros macrófagos reiniciando el proceso multiplicativo.

El parásito puede quedar en la zona dérmica, puede invadir por paso directo o por metástasis sanguínea las mucosas, o bien invadir sistemas orgánicos ricos en macrófagos.

La existencia de algunos receptores comunes para la porción Fc de inmunoglobulinas y para los componentes C3b del complemento en las membranas del parásito y del macrófago, hacen que se procese una fagocitosis inducida (Genaro, 1995). Las células de Langerhans también pueden ser invadidas por el parásito. Estas células dendríticas son las principales presentadoras de antígenos de la piel que estimulan a los linfocitos T y a las células de memoria en los ganglios linfáticos (Van Wilsem y col., 1994). Las células dendríticas mantienen el parásito por periodos prolongados, contribuyendo a mantener la inmunidad protectora (Moll y col., 1995).

I.2. EL VECTOR

Los flebotominos son pequeños dípteros que pertenecen a la familia *Psychodidae*. Son los nematóceros más antiguos pues algunos fósiles datan de 120 millones de años y, en el Nuevo Mundo, de 26-30 millones de años (Williams, 1991).

No hay un acuerdo en la sistemática de los flebotominos al nivel de género y categorías (OMS, 1984; Young y Duncan, 1994). Según estos últimos autores, la clasificación taxonómica está compuesta por seis géneros de flebotominos y consideran *Psychodopygus* como subgénero de *Lutzomyia*, pues elevarlo a género implicaría elevar a otros subgéneros a género, tanto del Viejo como del Nuevo Mundo.

Reino	ANIMAL
Phylum	ARTHROPODA
Subphylum	MANDIBULATA
Clase	INSECTA
Subclase	PTERYGOTA
División	ENDOPTERYGOTA
Orden	DIPTERA
Suborden	NEMATOCERA
Familia	PSYCHODIDAE , Bigot, 1854
Subfamilia	PHLEBOTOMINAE Walker, 1851
Género:	<i>Brumptomyia</i> França y Parrot, 1921
	<i>Lutzomyia</i> França, 1924
	<i>Phlebotomus</i> Rondani y Berté, 1840
	<i>Sergentomyia</i> França y Parrot, 1920
	<i>Warileya</i> Hertig, 1948
	<i>Chinius</i> , Leng 1987

Son más de seiscientas las especies conocidas de estos dípteros. Poco más que treinta de ellas han sido demostradas como vectoras y pertenecen a los géneros *Phlebotomus* (Viejo Mundo) y *Lutzomyia* (Nuevo Mundo). Para que sea considerada vectora de *Leishmania*, una especie tiene que obedecer a unos criterios que fueron descritos por la OMS (1990) de la siguiente forma:

- Los hábitos alimenticios del vector deben incluir el reservorio y el hombre.
- Las especies de *Leishmania* encontradas en el vector deben ser las mismas que las encontradas en el hombre.
- El vector tiene que tener condiciones que favorezcan el desarrollo el parásito.
- La distribución geográfica del parásito debe ser compatible con la del vector.

La misma Organización (1984), considera que uno de los factores determinantes de los índices de transmisión es la capacidad vectorial que se mide como la frecuencia media de picaduras al hombre por una población de flebotominos vectores. Para Killick-Kendrick (1990), la abundancia de una especie de flebotominos en una zona no es suficiente para considerarla como vectora, pues la transmisión del parásito depende de la longevidad de los flebotominos y la frecuencia de sus picadas.

I.2.1. Morfología y biología de los flebotominos

Son dípteros de tamaño muy pequeño que no pasan de los 5 mm. En reposo, tienen la característica de que sus alas se mantienen levantadas formando entre sí un ángulo de 90°. El cuerpo está cubierto de una pilosidad muy intensa y cuando recibe la luminosidad refleja un color amarillento. Tienen patas muy largas. La parte posterior del abdomen es bifurcada en los machos y redondeada en las hembras. Observase, también, la presencia de pelos en varias partes de la superficie del cuerpo que auxilian en la taxonomía para algunas especies. Su característica principal es el hábito de la hematofagia de las hembras y, por esto, presentan las mandíbulas y maxilas adaptadas para la succión de la sangre.

Los flebotominos pasan por un proceso de metamorfosis completo: huevo, cuatro estadios larvarios y pupa.

I.2.1.1. Huevos

Son de color oscuro y forma elíptica midiendo cerca de 300-400 μm de largo y 90-150 μm de ancho (Kettle, 1995). Según Barretto (1942), el tiempo que precede a la oviposición es de siete a diez días, pero en *Lu. longipalpis* observó que 99,6% de las hembras realizaban la oviposición entre el cuarto y quinto día. En el momento de la puesta de huevos la hembra se pone inmóvil sobre una superficie, haciendo pequeños movimientos de contracción abdominal para expulsar los huevos. Normalmente son puestos en sitios húmedos, como bajo los árboles o bien junto al estiércol de animales, en partes donde no da el sol (Dougherty y col., 1992; Young y Duncan, 1994). El número medio de huevos puesto por las hembras es de 40 a 70, dependiendo de la especie. En el caso de *Lu. intermedia* criada en laboratorio por Rangel y col. (1985), observaron que ponían un máximo de 106 y un mínimo de 4 huevos por hembra. La eclosión suele tener lugar transcurrido un período de unos 10 días (Young y Arias, 1992). La oviposición se realiza a temperaturas que oscilan entre 20 y 30 °C y la eclosión a temperaturas entre 25 y 27 °C (Forattini, 1973).

I.2.1.2. Larvas

Éstos dípteros pasan por cuatro estadios larvarios que son semejantes a orugas. En el abdomen poseen unos órganos locomotores semejantes a falsas patas. Sus hábitats preferidos son los sitios húmedos y ricos en materia orgánica, a partir de la cual se alimentan (Gállego, 1997).

Los desplazamientos se incrementan a medida que evolucionan de estadio, para ingerir una mayor cantidad de alimento y para alcanzar un nivel superior en el suelo en que viven. La evolución larvaria tiene mayor efectividad con temperaturas entre 25 y 27 °C. En regiones donde la temperatura media es mas elevada, la evolución larvaria ocurre entre los 26 y 30 °C (Forattini, 1973). En condiciones favorables de temperatura y humedad, el ciclo larvario se completa en unas 2-3 semanas o se prolonga hasta dos meses (Gállego, 1998)

I.2.1.3. Pupas

Permanecen en la superficie del suelo, adheridas a hojas de árboles, maderas o piedras. Su respiración ocurre por espiráculos. La coloración, blanca al principio, se va oscureciendo después de algunas horas y cogiendo un tono amarillo. Antes de la eclosión ya presentan un color oscuro. Esta fase de reposo dura cerca de 7 a 12 días (Young y Arias, 1992). La temperatura y humedad tienen mucha influencia sobre el desarrollo de la pupa (Forattini, 1973).

I.2.1.4. Adultos

Después de la eclosión, el adulto necesita de unas horas para el endurecimiento de la quitina que le permitirá volar. Chaniotis (1967) observó, en laboratorio, que los machos nacen antes de las hembras.

Normalmente la cópula ocurre después de la primera ingesta sanguínea y de dos a diecinueve días después tiene lugar la oviposición (Williams, 1991). Los lugares de reposo son, preferencialmente, templados, húmedos, oscuros y sin corriente de aire.

Sus patas largas pero de poca funcionalidad, su poca capacidad de vuelo y la poca espesura de la cutícula obliga a estos dípteros a buscar abrigos en locales que no tengan mucha humedad, ni calor o luz excesiva. Se ponen en huecos, madrigueras de animales o excavaciones donde el microclima sea favorable y sólo salen de allí cuando las condiciones son satisfactorias.

La gran mayoría de los flebotominos atacan al atardecer y a las primeras horas de la noche, pero hay algunas especies que atacan incluso durante el día o a cualquier hora de la noche. La mejor temperatura para la actividad de toma de sangre es entre 25 y 28 °C (Lewis, 1971).

Barretto (1943) observó, en el sur de Brasil, la actividad de *Pintomyia fischeri* (= *Lu. fischeri*, Forattini, 1971; Gomes y col., 1986) a una temperatura de 10 °C y de *Psychodopygus intermedius* (= *Lu. intermedia*, Forattini, 1971; Gomes y col. 1986) a 9,5 °C. Muchos de los flebotominos antropofílicos de las Américas son exofágicos (Young y Arias, 1992), por lo que tan sólo pican a las personas fuera de sus casas.

Sólo las hembras son hematófagas, pero ambos sexos se alimentan de jugos vegetales ricos en azúcares que constituyen la principal fuente de energía para el desarrollo de los parásitos en su interior.

La cantidad de sangre ingerida por un flebotomo en una única picada, normalmente, corresponde a su propio peso, cerca de 0,5 a 0,6 mg (Freitas y col., 1960). Después de la toma de sangre tienen dificultad para volar, por lo que reposan en las proximidades del hospedador. La capacidad de vuelo de estos insectos es mala. Vuelan pocos metros de distancia basándose en vuelos cortos o dando pequeños saltos (Lewis, 1971). En Panamá se observó que algunos se habían desplazado hasta 200m, pero la mayoría no pasó de un radio de 57m (Young y Arias, 1992). En el sur de Francia fueron observadas hembras sin alimentar que pudieron desplazarse más de 2 km pero ello sólo ocurría en condiciones de vientos favorables (Killick-Kendrick y col., 1984).

Normalmente, las hembras mueren inmediatamente después de la puesta. Sin embargo, Barretto (1943) observó, en condiciones experimentales, que *P. fischeri* y *P. intermedius* mueren en menor proporción que otras especies, después de la puesta de huevos. Por lo tanto, si gran parte de las hembras mueren después de la oviposición, la transmisión del parásito es bastante reducida, restando la actividad vectorial para los ejemplares que permanecen vivos y que realizan otras tomas de sangre, o bien las hembras que realizan varias ingestas de sangre antes de la oviposición.

El tiempo de vida de estos dípteros oscila entre los diez y veinte días para las hembras que se hayan alimentado de sangre. Las hembras vírgenes suelen vivir un poco más. Los machos normalmente viven un período más corto que ellas.

I.2.2. El vector en el Nuevo Mundo

En el Nuevo Mundo hay cerca de 400 especies de flebotominos descritas. De éstas, unas 88 pican el hombre.

En la tabla nº 1 se indica algunas de las especies que están consideradas como vectoras, el parásito que transmiten, así como el país en que se encuentran.

Tabla nº 1 – Especies de *Lutzomyia*, parásito que transmite, tipo de leishmaniosis y las principales zonas Endémicas

Nuevo Mundo – género <i>Lutzomyia</i>			
Subgénero	Especie	Parásito transmitido	Principales zonas con focos endémicos
<i>Nyssomyia</i>	<i>anduzei</i>	<i>L.guyanensis</i> (LCZ)	Brasil
	<i>flaviscutellata</i>	<i>L.amazonensis</i> (LCZ)	Brasil, Colombia
	<i>olmeca olmeca</i>	<i>L.mexicana</i> (LCZ)	Guyana Francesa Belice, México
	<i>trapidoi</i>	<i>L.panamensis</i> (LCZ)	Colombia, Costa Rica y
	<i>umbratilis</i>	<i>L.guyanensis</i> (LCZ)	Panamá
	<i>whitmani</i>	<i>L.guyanensi</i> (LCZ)	Brasil, Colombia, Guyana Francesa
	<i>ylephiletor</i>	<i>L.panamensis</i> (LCZ)	Brasil Costa Rica, Panamá
<i>Psychodopygus</i>	<i>carrerai carrerai</i>	<i>L.braziliensis</i> (LCZ)	Bolivia
	<i>llanos martinsi</i>	<i>L.braziliensis</i> (LCZ)	Bolivia
	<i>panamensis</i>	<i>L.panamensis</i> (LCZ)	Panamá
	<i>yucumensis</i>	<i>L.braziliensis</i> (LCZ)	Bolivia
	<i>welcomei</i>	<i>L.braziliensis</i> (LCZ)	Brasil
<i>Verrucarum</i>	<i>spinicrassa</i>	<i>L.braziliensis</i>	Colombia
<i>Lutzomyia</i>	<i>gomesi</i>	<i>L.panamensis</i> (LCZ)	Panamá
	<i>longipalpis</i>	<i>L.chagasi</i> (LVZ)	Bolivia, Brasil, Colombia

Tomado de OMS (1990)

LCZ= Leishmaniosis cutánea zoonótica

LVZ= Leishmaniosis visceral zoonótica

I.2.3. El vector en Brasil

En Brasil, los flebotominos son conocidos popularmente por “birigüi, asa caída, pólvora, cangalhinha, tatuquira y freboti”. La gran variedad de nombres indica que las personas, aunque no tengan conocimientos científicos, son capaces de distinguirlos de otros insectos.

Algunas de las especies de *Lutzomyia* consideradas vectores en Brasil son las que se indican en la tabla nº 2.

Tabla n° 2 – Especies de *Lutzomyia* consideradas vectoras de *Leishmania* en Brasil y el respectivo parásito que transmiten.

Subgénero	Especie	Parásito transmitido
<i>Lutzomyia</i>	<i>longipalpis</i>	<i>L.(L.) chagasi</i>
<i>Pintomyia</i>	<i>peessoai</i>	<i>L.(V.) braziliensis</i>
Grupo <i>Migonei</i>	<i>migonei</i>	<i>L.(V.) braziliensis</i>
<i>Trichophoromyia</i>	<i>ubiquitalis</i>	<i>L.(V.) lainsoni</i>
<i>Nyssomyia</i>	<i>anduzei</i>	<i>L.(V.) guyanensis</i>
	<i>flaviscutellata</i>	<i>L.(L.) amazonensis</i>
		<i>L.(L.) pifanoi</i>
		Complejo <i>L.(L.) mexicana</i>
	<i>intermedia</i>	<i>L.(V.) braziliensis</i>
	<i>nociva</i>	<i>L.(L.) amazonensis</i>
	<i>shawi</i>	Complejo <i>L.(V.) braziliensis</i>
	<i>umbratilis</i>	<i>L.(V.) guyanensis</i>
	<i>whitmani</i>	<i>L.(V.) guyanensis</i>
	Complejo <i>L.(V.) braziliensis</i>	
	<i>L.(V.) braziliensis</i>	
<i>Psychodopygus</i>	<i>amazonensis</i>	<i>L.(V.) braziliensis</i>
	<i>ayrosai</i>	<i>L.(V.) naiffi</i>
	<i>chagasi</i>	Complejo <i>L.(V.) braziliensis</i>
	<i>hirsuta</i>	Complejo <i>L.(V.) braziliensis</i>
	<i>paraensis</i>	<i>L.(V.) braziliensis</i>
	<i>maripaensis</i>	Complejo <i>L.(V.) braziliensis</i>
	<i>wellcomei</i>	<i>L.(V.) braziliensis</i>

Tomado de Williams, 1995

I.3. EL RESERVORIO

El reservorio de una enfermedad es aquel que garantiza la existencia y supervivencia del agente etiológico y es la fuente de infección del hombre en un área endémica (OMS, 1984).

Las leishmanias necesitan mantenerse en un animal vertebrado para poder completar su ciclo de vida. De allí son captadas por el vector, en el momento en que éste se va a alimentar de la sangre y transmitidas a otro vertebrado en la siguiente picada del insecto. Generalmente, hay un hospedador reservorio primario y otro secundario para cada tipo de *Leishmania*. Los hospedadores accidentales son mamíferos que, aunque estén infectados, no representan ningún papel en el mantenimiento del ciclo de la enfermedad (OMS, 1990).

Para identificar un animal como reservorio es necesario que éste sea indispensable para la vida del parásito. Para que se pueda considerar un animal como reservorio de un parásito la Organización Mundial de la Salud (1990) recomienda basarse en los siguientes criterios:

- El reservorio debe ser lo bastante abundante y longevo para constituir una fuente apreciable de alimento para los flebotominos.
- Es indispensable un intenso contacto entre el reservorio y el flebotomo.
- La proporción de animales que resultan infectados en el curso de su vida debe ser considerable y puede superar al 20%.
- El período de la infección en el reservorio debe ser largo y la infección relativamente no patógena. Los parásitos deben estar presentes en la piel o bien en la sangre y en número suficiente para que puedan ser captados por el flebotomo.
- Los parásitos de los reservorios deben ser indiferenciables de los del hombre, siendo por ello necesaria su identificación.

I.3.1. El reservorio en el Nuevo Mundo

Una gran variedad de especies de animales han sido citadas albergando distintas especies de *Leishmania* en el Nuevo Mundo. Así, entre los perezosos, el *Choloepus didactylus* es un importante reservorio de *L. (V.) guyanensis* en Brasil y Guyana Francesa, *C. hoffmani* es el reservorio primario de *L. (V.) panamensis* en Brasil, Colombia, Costa Rica y Panamá y *Bradypus griseus* es un reservorio de *L. (V.) panamensis* en Costa Rica y Panamá (OMS, 1990).

El oso hormiguero, *Tamandua tetradactyla* es el reservorio primario de *L. (V.) guyanensis* en la Guyana Francesa y Brasil. La zarigüeya (*Didelphis marsupialis*) desempeña el papel de reservorio secundario de *L. (V.) guyanensis* y *L. (L.) amazonensis* en Brasil (OMS, 1990). En Belice, Guatemala y Yucatán, fue encontrada *L. mexicana mexicana* parasitando a roedores de los géneros *Ototylomys*, *Heteromys*, *Nyctomys* y *Sigmodon* (Lainson y Shaw, 1978).

I.3.2. El reservorio en Brasil

Son muchos los animales que sirven de reservorio a las especies de leishmanias existentes en Brasil. En la tabla nº 3 se indican algunos animales considerados reservorios en Brasil, así como el parásito que albergan y la región donde son encontrados.

Tabla n° 3 - Reservorios de *Leishmania* en Brasil

<i>Leishmania</i>	Animal	Región	Referencia	
<i>L. (L.) chagasi</i> (= <i>L. (L.) infantum</i>)	<i>Canis familiaris</i> <i>Dusicyon vetulus</i> <i>Dusicyon thous</i>	Áreas endémicas del Estado Ceará Estado Ceará y Pará	Deane y Deane (1954) Deane y Deane (1954) Silveira y col. (1982) Sherlock y col. (1984)	
	<i>Didelphis albiventris</i>	Estado de Bahía		
<i>L. (V.) guyanensis</i>	<i>Didelphis marsupialis</i> <i>Tamandua tetradactyla</i> <i>Choloepus didactylus</i> <i>Procedimos guyanensis</i>	Norte de Brasil	Lainson y col. (1981 y Arias y Naiff (1981)	
	<i>Proechymus guyanensis</i> <i>Metachirus nudicaudatus</i> <i>Philander opossum</i> <i>Didelphis marsupialis</i> <i>Marmosa cinerea</i> <i>Proechimus spp</i> <i>Cerdocyon sp</i> <i>Oryzomys sp</i>	Norte de Brasil Región amazónica Región amazónica	Lainson y col. (1981 y Arias y Naiff (1981) OMS (1990) Lainson y Shaw (1978) Lainson y Shaw (1978)	
	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>Cuniculus paca</i> <i>Dasyprocta azarae</i> <i>Kannabateomys amblyonix</i> <i>Akodon arviculoides</i> <i>Oryzomys nigripes</i> <i>Oryzomys capito laticeps</i> <i>Didelphis marsupialis</i> <i>Oryzomys capito</i> <i>Oryzomys concolor</i> <i>Oryzomys sp</i> <i>Neacomys spinosus</i> <i>Nectomys squamipes</i> <i>Marmosa murina</i> <i>Rattus rattus</i> <i>Proechimys sp</i>	Estado de São Paulo Estado de Pará Estado Mato Grosso Región amazónica	Forattini (1960) Forattini y col. (1972) Forattini y col. (1973) Lainson y Shaw (1979) Lainson y Shaw (1970) OMS (1990) Lainson y Shaw (1978)
		<i>Leishmania sp</i>	<i>Didelphis marsupialis</i> <i>Proechimys dimidiatus</i> <i>Rattus n. norvergicus</i> <i>Oryzomys goeldii</i>	Estado de São Paulo Rio de Janeiro Estado de Pará
<i>Marmosa murina</i> <i>Oryzomys capito</i> <i>Proechimys guyanensis</i> <i>Dasytus novemcinctus</i> <i>Proechimys inheringi</i>			Norte de Brasil Nordeste de Brasil	 Cuba-Cuba y col. (1984)

Tomado de Lainson y Shaw (1978); Gomes (1986); OMS (1990)

Además de lo recogido en la tabla n° 3, existen otras referencias a especies que actúan como reservorios. En este sentido, Silveira y col. (1991) aislaron *Leishmania* del roedor *Agouti paca* en el estado de Pará. En São Paulo, Yoshida (1979) encontró una cepa de *Leishmania* en *Didelphis marsupialis aurita*, tras la inoculación de macerado de hígado y bazo en hámsters. Forattini (1960) relata que encontró, en São Paulo, roedores (*Kannabateomys amblyonix*, *Cuniculus paca* y *Dasyprocta azarae*) presentando *Leishmania*. En el estado de Ceará, Alencar y col. (1960) consiguieron cultivos de *Leishmania* sp a partir de sangre de *Rattus rattus alexandrinus*.

En las leishmaniosis que ocurren en regiones de colonizaciones antiguas, relacionadas con el proceso migratorio y la formación de poblados en la periferia de los centros urbanos, parece haber ocurrido una adaptación entre el vector, parásitos y algunos animales domésticos (MS/FUNASA, 2000).

Varios animales domésticos han sido encontrados, con frecuencia, infectados por *L. (V.) braziliensis*, como por ejemplo: caballos (Yoshida y col., 1990; Barbosa-Santos y col., 1994), burros (Genaro, 1991) y gatos (Mello, 1940). El perro fue encontrado infectado por este parásito por muchos autores (Falqueto y col., 1986; Grimaldi y col., 1989; Falqueto y col., 1991; Barbosa y col., 1999). De la misma manera, el perro también fue encontrado infectado por *L. (L.) chagasi* causante de la leishmaniosis visceral en Brasil, siendo considerado la principal fuente de infección (Chagas, 1938; Nunes y col., 1988; Courtenary y col., 1994; Dietze y col., 1997; Ashford y col. 1998).

I.4. CICLO EPIDEMIOLÓGICO Y FORMAS DE TRANSMISIÓN

Generalmente, la leishmaniosis es transmitida al hombre a través de la picada del flebotomino vector perteneciente al género *Phlebotomus* (Viejo Mundo) o *Lutzomyia* (Nuevo Mundo).

La leishmaniosis en el hombre suele ser una zoonosis donde éste se introduce en el ciclo epidemiológico accidentalmente, pues el vector tiene su hábitat principal en la floresta, donde encuentra animales para chupar la sangre y con esto garantizar su supervivencia. Así que, la entrada del hombre en el bosque, sea por trabajo o para construir sus casas o carreteras, son factores que han permitido el contacto con el vector y la consecuente contaminación por el parásito. Sin embargo, es muy frecuente encontrar flebotominos en el peridomicilio, donde se alimentan de sangre de animales domésticos y del hombre.

Según Garnhan (1965), el ciclo biológico presenta distintas formas epidemiológicas, dependiendo del tipo de reservorio vertebrado. En el **ciclo enzoótico** los mamíferos salvajes actúan como hospedadores, con la introducción accidental del hombre en el ciclo; el **ciclo zooantroponótico** tiene lugar cuando el reservorio es un animal doméstico del entorno del hombre, tal como ocurre con el perro y, el **ciclo antroponótico**, en que el hospedador animal desaparece y el hombre es el único hospedador vertebrado del parásito

De acuerdo con la OMS (1984), la transmisión de la leishmaniosis al hombre es estacional y guarda relación con las fluctuaciones en la densidad y edad de las poblaciones de vectores y, probablemente, con la dinámica demográfica de los reservorios. Las variaciones climáticas de pluviosidad, temperatura y viento son factores que afectan a las poblaciones de flebotominos, influenciando en su actividad.

Además de la transmisión que tiene lugar a través del vector, se han demostrado otras formas de adquirir el parásito. Una de ellas es por la transfusión sanguínea comprobada en diversos estudios (Cohen y col., 1991; Palatnik de Souza y col., 1996; Luz y col., 1997; Le Fichoux y col., 1999) o bien que la transfusión se considera una forma sospechosa de adquirir el parásito (Grogl y col. 1993; Riera y col., 2001).

La leishmaniosis también puede ser transmitida de persona a persona, especialmente entre los usuarios de drogas inyectables, al compartir las jeringuillas (Alvar, 1997; WHO, 1998). Se han demostrado otras formas de transmisión como los nueve casos descritos en el mundo de leishmaniosis visceral congénita donde los parásitos, dentro de los leucocitos, podrían haber atravesado la fina membrana que separa la circulación fetal de la maternal (Low y col., 1926; Meinecke, 1999). La transmisión sexual es rara pero, en 1960, Symmers, diagnosticó un caso en Londres. También ya fueron notificados casos en accidentes de laboratorio, por la auto-inoculación con formas de cultivos infectantes (Genaro, 1991).

I.5. FORMAS CLÍNICAS

La leishmaniosis presenta distintas formas clínicas, siempre relacionadas con la especie de *Leishmania*, la interacción entre el parásito y el hospedador, así como la capacidad de respuesta dada por el organismo infectado. Puede causar desde formas asintomáticas, especialmente en las formas viscerales o algunas lesiones de las formas cutáneas, hasta infecciones muy graves que, si no reciben el tratamiento correcto, pueden ser fatales.'

I.5.1. Leishmaniosis Tegumentaria Americana (LTA)

I.5.1.1. Leishmaniosis cutánea

Las especies de *Leishmania* que producen estas formas clínicas pertenecen a los complejos *mexicana*, *braziliensis* y *amazonensis*. La leishmaniosis cutánea es una enfermedad de la piel

caracterizada por la presencia de lesiones ulcerosas, únicas o múltiples. El periodo de incubación dura entre dos semanas y dos meses, con la aparición de un nódulo pequeño en el sitio de inoculación del parásito. Normalmente tiene forma redondeada, de base indurada, es indoloro y aumenta progresivamente de tamaño y, como consecuencia de la necrosis en el centro de la región granulomatosa inducida por la respuesta inmune, se ulceran (Weigle y Saravia, 1996). Observase también otras formas de lesiones como sean las úlceros-crostosas, verrucosas o papulosas.

Normalmente las lesiones aparecen en el lugar de la picadura del vector (Dedet, 1994), en las partes descubiertas del cuerpo: miembros inferiores 38,3%, miembros superiores 32,2%, tronco 6%, cabeza 26,4% (Pessôa, 1958). Esas lesiones tienen aspecto pápulo-eritematoso, pápulo-ulcerado o forunculoide.

I.5.1.2. Leishmaniosis mucocutánea - También denominada espundia. Esta forma de leishmaniosis está presente, fundamentalmente, en el Nuevo Mundo y es causada por *L.(V.) braziliensis* o *L.(V.) panamensis*. Se caracteriza por su tendencia a producir metástasis en tejidos mucosos por diseminación linfática o hematógena.

La primoinfección es similar a los casos de leishmaniosis cutáneas pero al cabo de meses o años de evolución aparece destrucción de los cartílagos nasales y del paladar blando, dando lugar a mutilaciones extensas con afección de los tejidos adyacentes. Las lesiones mucosas suelen aparecer en pacientes con tratamiento inadecuado. Estas lesiones nunca se curan espontáneamente. Según la OPS (1996), la metástasis de los tejidos mucosos puede ocurrir simultáneamente con una lesión crónica de leishmaniosis cutánea o presentarse hasta 24 años después de la infección original.

I.5.1.3. Leishmaniosis cutáneo difusa

Causada por *L. pifanoi* en Venezuela y *L. (L.) amazonensis* en Brasil. Aparecen pápulas discretas que lentamente se transforman en placas infiltradas y nódulos múltiples, en general sin ulceración. Tiene un aspecto clínico de la lepra lepromatosa cuando las lesiones son en las cejas, la nariz y orejas. Está asociada a una deficiencia inmunológica del paciente donde la

respuesta inmune celular está deprimida en relación al antígeno de *Leishmania*. La enfermedad no cura espontáneamente y es muy resistente al tratamiento.

I.5.2. Leishmaniosis visceral

Es una enfermedad generalmente crónica que afecta especialmente a niños menores de cinco años. Puede presentarse bajo las formas **asintomática** o **oligosintomática** que es la que más ocurre en zonas endémicas. En este caso, aparecen manifestaciones inespecíficas como fiebre, tos seca, diarrea. La forma **aguda** caracterizase por fiebre alta, anemia y estado de debilidad progresiva, hepatoesplenomegalia, tos seca y diarrea acentuada. Aparece muchas veces en pacientes inmunodeprimidos como los afectados por el HIV.

I.6. DIAGNÓSTICO

Diagnóstico clínico que en la leishmaniosis cutánea puede ser basado en las características de las lesiones, que suelen presentarse con el borde más elevado que el centro de la herida. Es una lesión que permanece abierta y tiene el fondo granoso con o sin secreción.

Examen parasitológico que se hace a través de la biopsia o aspirado del borde de la lesión y observado al microscopio, después de haberlo teñido con Giemsa. El de cultivo, cuando se desea aislar la cepa para su identificación o bien para detectar la presencia del parásito. Se obtiene la muestra a través del aspirado del borde de la lesión o de linfonodos y se inicia el cultivo en el medio elegido.

La técnica de intradermorreacción de Montenegro es una técnica utilizada en estudios epidemiológicos que detecta la memoria inmunológica y, por esto, sirve para identificar la población que tuvo contacto con el parásito. Esta prueba revela la hipersensibilidad celular propia de las leishmaniosis cutáneas. Consiste en aplicar, intradérmicamente, en la parte interna del antebrazo o en la parte externa del brazo, 0,1 ml de antígeno. En el caso de la reacción ser positiva, se forma un endurecimiento en el lugar de la aplicación que se puede observar dentro en un período de 48 a 72 horas. Tras ese período la reacción tiende a desaparecer.

El **inmunodiagnóstico** es realizado principalmente por las técnicas de ELISA, Dot-ELISA, PCR, IFI y *Western Blot* que detectan la presencia de anticuerpos. Para la leishmaniosis visceral el diagnóstico se basa en los aspectos clínicos que presenta el paciente, en métodos de cultivo y aislamiento del parásito y las técnicas inmunológicas.

Técnicas de PCR que detectan el DNA genómico o kinetoplástido del parásito.

I.7. TRATAMIENTO

El tratamiento se basa, principalmente, en el uso de antimoniales pentavalentes (Sb^5), el estibogluconato de sodio (Pentostam®) y el antimoniato de meglumina (Glucantime®). El primero utilizado en países de influencia inglesa y el segundo en países de influencia hispana o francesa. Los antimoniales son indicados para el tratamiento de todas las formas de leishmaniosis. Sin embargo, en las formas mucosa y mucocutánea exigen mayores cuidados por presentar resultados más lentos. Para la leishmaniosis visceral es indispensable la internación hospitalaria del paciente durante todo el tratamiento.

El Ministerio de Salud de Brasil recomienda que las dosis de la terapia antimonial sea de $20mg/Sb^5/kg/día$, durante 20 días seguidos para la leishmaniosis cutánea y para las lesiones mucosas es la misma dosis aplicada por 30 días, de preferencia en ambiente hospitalario.

En caso de no haber respuesta satisfactoria con el tratamiento por antimoniales pentavalentes se puede optar por Anfotericina B o Pentamidina. La Anfotericina B tiene aplicación endovenosa, gota-a-gota, lentamente, durante cuatro horas. Esta debe ser diluida en 250 ml de suero glicosado a 5%, alternando su aplicación con esta misma dilución añadida de 50 a 100 mg de hidrocortisona, para prevención de efectos colaterales. Se inicia con $0,5mg/kg/día$, aumentando gradualmente hasta el $1mg/día$, en días alternados (MS/FUNASA/2000). Es bastante eficaz pero su uso es muy limitado por ser de vía parenteral y muy tóxico (Thakur, 1995).

Para la Pentamidina es recomendada la dosis de $4mg/kg/día$, intramuscular a cada dos días alternados hasta el máximo de 2g. Ésta, por ser de baja toxicidad representa un sustituto de los antimoniales, presentando una efectividad semejante a éstos. El paciente debe reposar por

15 minutos antes y después de la aplicación y es recomendado aplicar después de alimentarse debido a su acción hipoglucémica (MS/FUNASA, 2000).

La leishmaniosis cutánea puede curar espontáneamente, responder al tratamiento o ser difícil de tratar con medicamentos (Berman, 1997). La cura espontánea depende del tipo y localización de las lesiones y varía mucho de una región geográfica para otra.

1.8. LEISHMANIOSIS EN BRASIL

En Brasil, la leishmaniosis representa un grave problema de salud pública, como consecuencia de la existencia de los factores favorables como los climáticos, geográficos y sociales (Vieira, 1977). Los índices de incidencia y prevalencia son muy elevados, especialmente los de la leishmaniosis cutánea.

Hasta los años cincuenta, en todos los estados ya se había notificado casos de leishmaniosis cutánea, cuando en esa época y, hasta el inicio de los años 60, hubo un declive de casos dado a la relativa estabilidad de las poblaciones rurales. Sin embargo, nuevos brotes han surgido, tanto de leishmaniosis cutánea como visceral, en áreas de nuevas colonizaciones como en Amazonia y el centroeste del país, donde la población inmigrante fácilmente se infectaba.

La leishmaniosis visceral está distribuida en la mayoría de los estados de la federación. La región nordeste del país abarca el 92% de los casos. En media son registrados cerca de 2000 casos por año y el coeficiente de incidencia alcanza los 20,4 casos/100.000 habitantes en algunas localidades de estados del nordeste, como Piauí, Maranhão y Bahia. La tasa de letalidad llega a 10% en algunos lugares (Guia de Vigilancia Epidemiológica/MS).

Hasta la década de los setenta, los estudios epidemiológicos evidenciaban que la leishmaniosis cutánea estaba directamente relacionada a las actividades profesionales, especialmente los trabajadores de la selva en la extracción de madera, minerales y construcción de carreteras (Neves, 1978). Esto ha representado una gran importancia epidemiológica porque era un período en que el país estaba muy empeñado en fomentar el desarrollo mediante la devastación de grandes áreas de selva virgen, la explotación agrícola,

mineral y la construcción de extensas carreteras (Lainson y Shaw, 1974). Por esa razón la enfermedad se presentaba con mayor casuística en hombres de 20 a 30 años.

En los años 1987, 1988 y 1989 se notificaron más de 20 mil nuevos casos por año de leishmaniosis cutánea. El alto número se debió a varios factores, como por ejemplo, la mejora en la detección de casos notificados, la urbanización de áreas endémicas, la construcción de viviendas muy cerca de la selva, grandes migraciones a áreas de nuevos poblamientos, la construcción de hidroeléctricas y la apertura de nuevos frentes de trabajo en las extracciones de minerales (OPS, 1996).

Sin embargo, si observamos los recientes cuadros epidemiológicos de la leishmaniosis cutánea, podemos verificar que la enfermedad, además de seguir con las características de una molestia profesional en la región amazónica y centroeste del país, se presenta en zonas que están devastadas desde hace mucho tiempo y utilizadas para la explotación agropecuaria, o incluso en las periferias y dentro de las ciudades.

En el periodo de 1985 a 1999, fueron registrados 388.155 casos autóctonos de leishmaniosis cutánea en el país. Comparándose los datos de 1985 (13.654 casos) con los de 1999 (30.550) se observa que aumentó de un 10,45 hasta un 18,63/100.000 habitantes (MS/FUNASA, 2000). Evidentemente, estos números no representan la dimensión real del problema o la expansión de la parasitosis en el territorio nacional, pues muchos casos ni llegan a las clínicas y otros que pueden no estar declarados. En todos los estados brasileños ya se han detectado casos de leishmaniosis cutánea. La gran concentración de la enfermedad está en los estados del norte, nordeste y centroeste.

Al sur de Brasil, el estado de Paraná, que hace límite con el estado de Santa Catarina, la enfermedad es considerada endémica (Teodoro y col., 1991; Silveira y col., 1996) y la Secretaria de Salud de Paraná considera que la leishmaniosis cutánea es epidémica en el estado. En Santa Catarina, Pessôa (1958) cita que Pupo notaba, en 1926, la existencia de casos autóctonos de la enfermedad en el estado. Después de esto, los primeros casos notificados fueron a finales de la década de 80 y, desde entonces, en varias regiones del estado han aparecido casos de leishmaniosis cutánea.

II. JUSTIFICACIÓN, OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

II. JUSTIFICACIÓN, OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

Todos los estados brasileños están afectados por la leishmaniosis, especialmente los del norte, nordeste y centroeste. En dos estados del sur (Rio Grande do Sul y Santa Catarina), la enfermedad es menos frecuente aunque pueda resultar subvalorada como consecuencia de los pocos estudios realizados, por lo que no hay datos concretos sobre su prevalencia. En Santa Catarina, a finales de los años 80, fueron notificados 14 casos de leishmaniosis cutánea en el oeste del estado, en los municipios de Quilombo y Coronel Freitas (São Thiago y Guida, 1990).

De 1994 a 1997, 26 nuevos casos fueron diagnosticados en el estado (Lima Filho y Steindel, 1998). De éstos, seis eran procedentes del oeste siendo dos autóctonos de pacientes de Chapecó, municipio vecino de Quilombo cuyas leishmanias fueron identificadas como *L. (L.) amazonensis* y *L. (V.) braziliensis* (Steindel y col, 1997; Grisard y col., 2000b). De 1998 a 2001 se diagnosticaron 29 casos en el estado, de los cuales 8 se consideraron autóctonos (M. Steindel, comunicación personal).

Es curioso que en esta región aparezca *L. (L.) amazonensis* que, en principio, está transmitida por *Lu. flaviscutellata* y *Lu. olmeca*. Estos flebotominos suelen presentarse en regiones pantanosas de Amazonia (Shaw y Lainson, 1972). Esto sugiere la necesidad de investigar la presencia de esta especie de *Leishmania* en la zona y las especies de flebotominos responsables de su vehiculación. En este sentido, es de señalar que la fauna de flebotominos de Santa Catarina es poco conocida. La especie, aparentemente, más común es *Lu. neivai* (revalidada de la sinonimia con *Lu. intermedia* por Marcondes, 1996).

El poco conocimiento sobre la leishmaniosis cutánea en el oeste del estado de Santa Catarina ha motivado la realización de este trabajo cuyos objetivos son:

- Realizar un estudio de los sueros del banco de sangre de Chapecó, para determinar posibles anticuerpos de *Leishmania* en los sueros de donantes procedentes de diferentes municipios de la región y con esto definir la zona del estudio epidemiológico.

- Determinar las tasas de prevalencia de la leishmaniosis humana en el municipio definido como zona de estudio, a través del diagnóstico clínico, pruebas serológicas y de la prueba de intradermorreacción de Montenegro.
- Identificar posibles reservorios de *Leishmania* entre especies de animales salvajes, domésticos y peridomésticos a través de diagnóstico clínico y técnicas serológicas.
- Realizar un muestreo entomológico cualitativo y cuantitativo de las diferentes especies de los flebotominos existentes en la zona, conocer su densidad, frecuencia, comportamiento poblacional y fenológico, así como, conocer la mejor forma de captura en esta zona.

II.1. PLAN DE TRABAJO

El trabajo epidemiológico se caracteriza por comprender el proceso salud-enfermedad en su dimensión colectiva y también por constituir un campo de prácticas de control de enfermedades (Barata, 1996). Si miramos la salud y la enfermedad en la dimensión colectiva, esto nos posibilita hacer una lectura política de estas cuestiones para poder evaluar las desigualdades sociales que pueden interferir en las dos situaciones. De acuerdo con esto, el presente trabajo ha constado de dos fases fundamentales:

- a) Fase inicial o prospectiva para determinar la extensión del problema en el oeste de Santa Catarina y localizar lo que sería la zona de estudio para la segunda fase;
- b) Fase de estudio de la naturaleza y dinámica del posible foco.

La fase de prospectiva se realizó mediante:

- a) Muestreo serológico con sueros del banco de sangre de Chapecó, que recibe sangre de diversos municipios del oeste del estado de Santa Catarina, que comprende un área de, aproximadamente, 300 km de radio;
- b) Encuesta retrospectiva, junto a la Secretaría de Salud y los médicos de la zona, de todos los casos de leishmaniosis declarados y no declarados o sospechosos ocurridos en los últimos años. A partir de los resultados obtenidos se escogió el municipio para realizar los estudios posteriores.

Para desarrollar un estudio epidemiológico, es necesario conocer todos los integrantes del ciclo de una enfermedad. En este sentido y centrando el trabajo en cada uno de los elementos que están asociados con la leishmaniosis, el parásito, el vector, el reservorio y el hombre, se siguieron los siguientes pasos:

- realización de una campaña informativa en la zona de estudio a través de entrevistas radiofónicas y conferencias sobre el tema en cada una de las localidades de estudio;
- aplicación del test de intradermorreacción de Montenegro en la población humana;
- muestreo entomológico cualitativo y cuantitativo de las diferentes especies de los flebotominos existentes en la zona, mediante métodos de captura diferenciados y en épocas distintas, determinando la densidad y distribución, así como identificación de las especies consideradas vectoras;
- estudio de los posibles reservorios domésticos, peridomésticos y selváticos, mediante técnicas serológicas;
- conocimiento de los factores climáticos, biológicos, geográficos, que pueden actuar en el proceso de transmisión de la leishmaniosis en la zona.

III. ZONA DE ESTUDIO

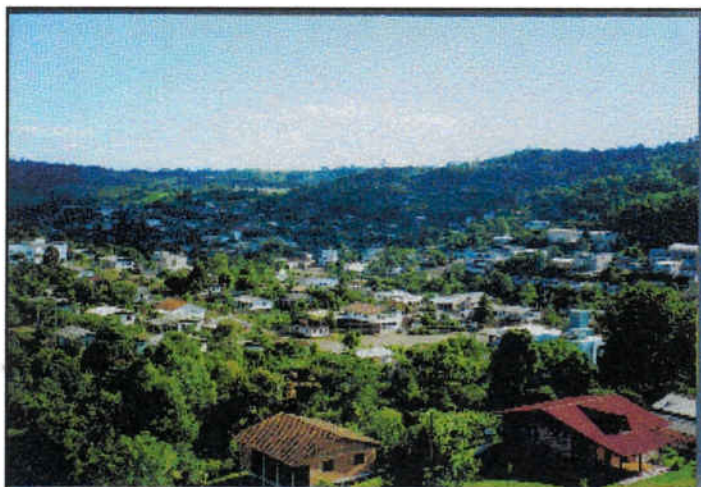
III. ZONA DE ESTUDIO

Este trabajo se realizó en el municipio de Quilombo, al oeste del estado de Santa Catarina, Brasil. El municipio fue creado en 1961 y tiene 280 km² de superficie. Sus límites son: al norte con el municipio de Formosa do Sul y Santiago do Sul; al sur con Coronel Freitas y Marema; al este con São Domingos y Marema y al oeste con União do Oeste y Jardinópolis.

La latitud es de 26°, 43' 34" S. Su longitud, 52° 43'14" W de Greenwich y una altitud media de 425 metros. Es una región habitada por descendientes de alemanes, italianos, polacos, negros y mestizos. La población es de 10.667 habitantes: 3.700 viven en la área urbana y 6.967 en la zona rural (datos cedidos por la Secretaría de Agricultura y Medio Ambiente de Quilombo).

Figura nº 1 - Localización geográfica de la zona de estudio

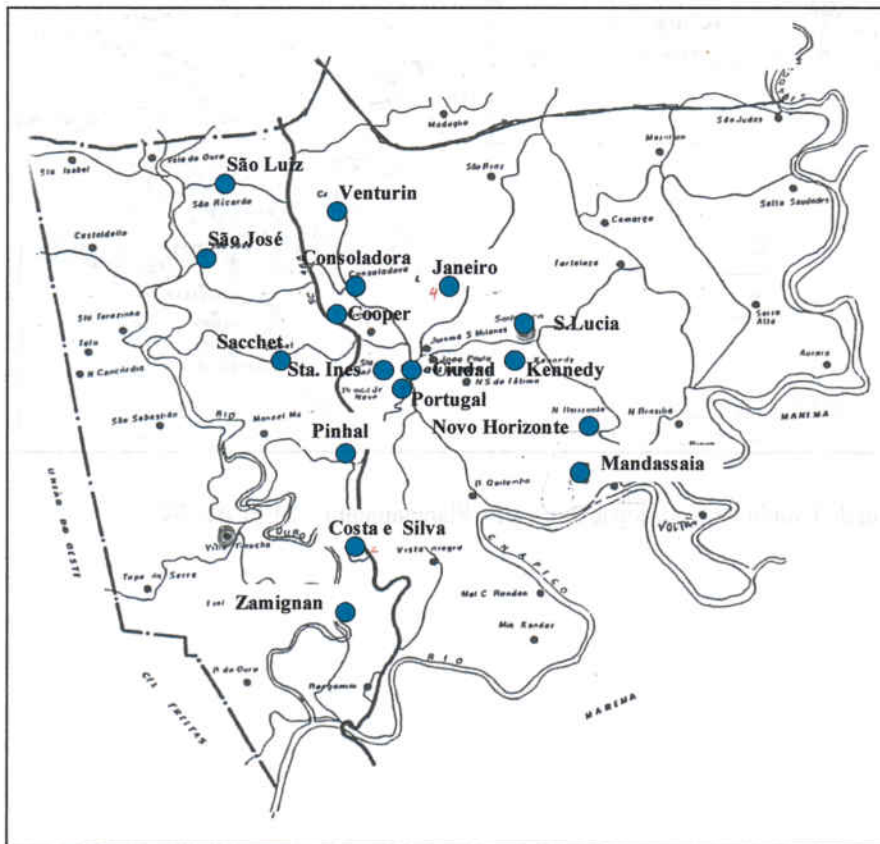
Vista general del municipio
de Quilombo



Brasil



Santa Catarina

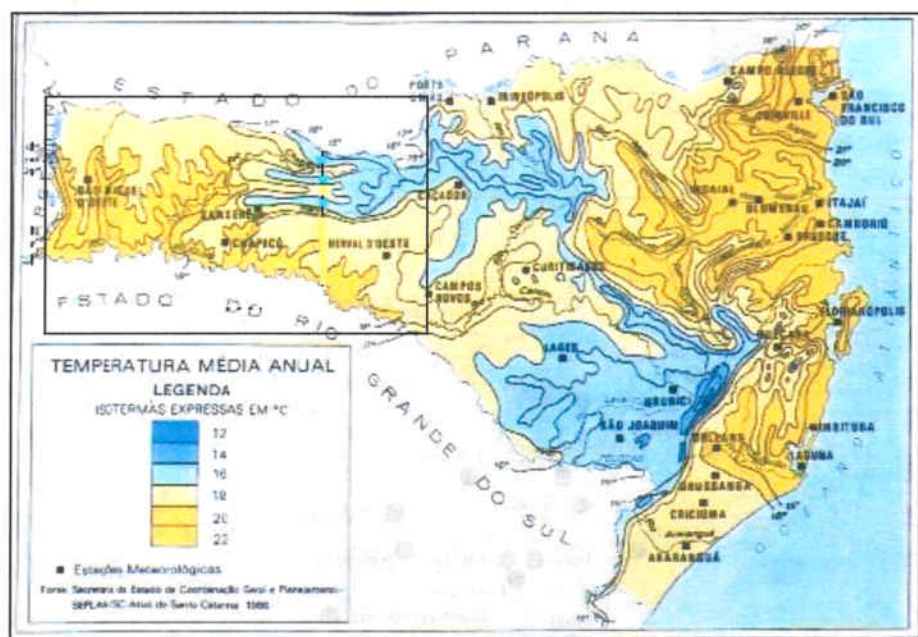


Quilombo

El relieve y suelo. La topografía es ondulada presentando montañas de formación basáltica y algunas áreas de superficies planas. El suelo presenta variaciones en sus aspectos físicos y químicos, predominando los de tipo litólico eutrófico. Hay zonas con suelos de alta fertilidad, pero otras en que la fertilidad es baja, comprometiendo el desarrollo de cultivos.

El clima. Es mesotérmico y húmedo, presentando una temperatura media anual entre 18,6 y 22 °C, con variaciones de 0 a 38 °C. La figura n° 2 muestra la forma climática del estado de Santa Catarina, donde se señala la región oeste, zona de este estudio.

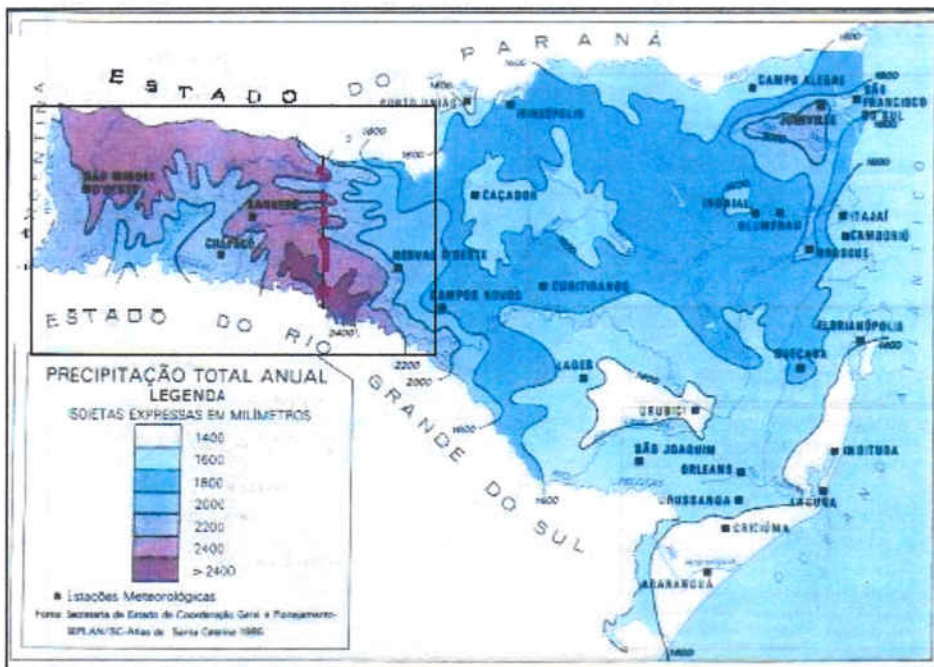
Figura n° 2 - Temperatura media anual de Santa Catarina, con señalización de la región oeste.



Fuente – Secretaria de Estado de Coordenação Geral e Planejamento – SEPLAN/SC

La precipitación total anual de la zona de estudio es aproximadamente de 2200 mm (Estación meteorológica de la EPAGRI). Es la zona del estado donde hay más frecuencia de lluvias.

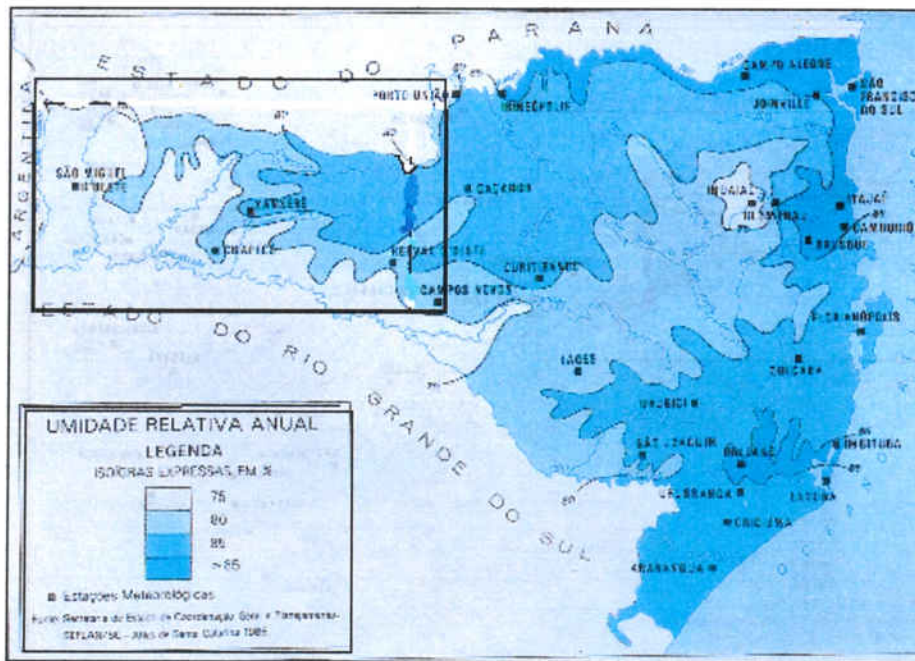
Figura nº 3 - Precipitación media anual de Santa Catarina, con señalización de la región oeste.



Fuente – Secretaria de Estado de Coordenação Geral e Planejamento – SEPLAN/SC

Humedad relativa – La humedad relativa media anual del oeste del estado, región en la cual está ubicado el municipio de Quilombo, oscila entre los 75 y 80% siendo la zona que presenta el índice más bajo del estado (figura nº 4).

Figura nº 4 – Humedad relativa del aire de Santa Catarina, con señalización de la región oeste



Fuente – Secretaria de Estado de Coordenação Geral e Planejamento – SEPLAN/SC

Hidrografía – El municipio está situado en la cuenca del río Uruguay y en la baja cuenca del río Chapecó, siendo éste el principal río y teniendo como afluente el río Quilombo que pasa en medio de la ciudad. Posee también fuentes y piscinas de agua mineral que atraen turistas de toda la región.

Vegetación - En la zona urbana es rara la presencia de bosque nativo pero en el interior, todavía quedan 1.316 hectáreas (4,7%) del área total de bosque virgen. La parte de bosque secundario representa 2.800 hectáreas (10%) del área total.

Servicios de Salud - Para atender a la población en la asistencia primaria a la salud, el municipio cuenta con un Centro de Salud y un hospital con 40 camas. Existe el servicio de los “Atendentes de Saúde” que están distribuidos por la ciudad y el campo atendiendo cada uno en los domicilios, cerca de 50 familias, dándoles las informaciones básicas de higiene y salud.

Las enfermedades más frecuentes son las de los aparatos respiratorio, circulatorio y digestivo. Además de éstas, están las enfermedades infecciosas y parasitarias que son un grave problema de salud pública, afectando especialmente a niños. En los últimos años, la región presenta alta endemia de Hepatitis B.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

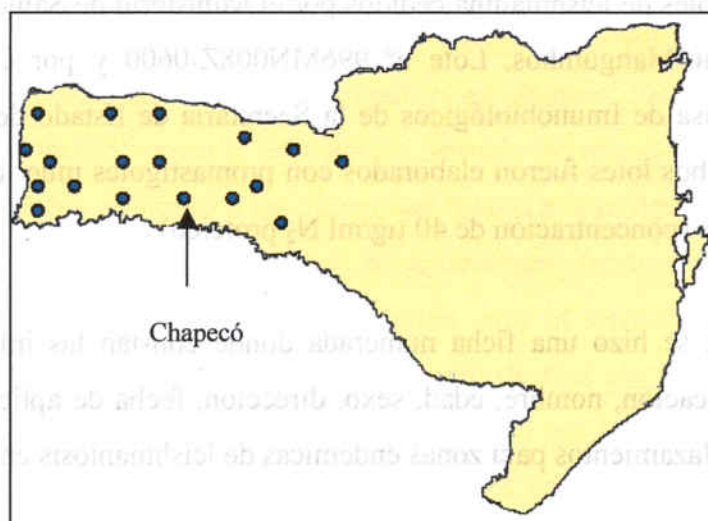
IV. MATERIAL Y MÉTODOS

IV.1. ESTUDIO CON LA POBLACIÓN HUMANA

IV.1.1. Análisis de sueros del banco de Sangre de Chapecó

Para conocer los datos de la prevalencia de la enfermedad en el oeste del estado, se empezaron los estudios analizando sueros del banco de sangre de Chapecó, municipio que está localizado en el centro de la zona y recibe sangre de donantes procedentes de varias localidades, correspondiendo a un área de, aproximadamente, 300 km de radio. Fueron analizados 671 sueros de ese banco de sangre, recogidos durante los años 1997 y 1998, mediante las técnicas de enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) y *Western Blot*. A partir de los resultados obtenidos en esta primera etapa, se definió y delimitó la zona del estudio epidemiológico, objeto de este trabajo. En la figura nº 5 se indica la localización geográfica de los municipios de los que se conoce la procedencia de los donantes de sangre del banco de sangre de Chapecó, de los cuales se utilizaron los sueros para este estudio.

Figura nº 5 – Localización de algunos de los municipios de procedencia de los donantes del banco de sangre de Chapecó, analizados en este estudio



Chapecó

IV.1.2. Estudio de la leishmaniosis en la población humana de Quilombo

Con los resultados obtenidos en los análisis realizados con los sueros del banco de sangre de Chapecó, se escogió el municipio de Quilombo para la realización del estudio epidemiológico.

En trece comunidades de este municipio se realizaron los tests de intradermorreacción de Montenegro (IDR). Las localidades fueron escogidas por haber presentado casos de leishmaniosis cutánea en los últimos años conforme muestran estudios realizados anteriormente (São Thiago y Guida, 1990). Otros factores que influyeron en la elección de estos puntos fueron su distribución geográfica dentro del municipio y las posibilidades de acceso.

Antes de proceder a la aplicación de la IDR, fue necesario hacer ciclos de conferencias en las comunidades para informar a la población sobre la leishmaniosis y explicar el objetivo del trabajo. Las personas fueron invitadas a participar de las reuniones a través de llamadas radiofónicas y en los encuentros siempre se pudo contar con la presencia y colaboración del personal de la Secretaría de Salud del municipio.

Se utilizaron dos lotes de leishmanina cedidos por el Ministerio de Salud de Brasil, Fundação Oswaldo Cruz, Bio-Manguinhos, Lote n° 996MN008Z-0600 y por el CPPI – Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos de la Secretaria de Estado de la Salud de Paraná, Lote n° 01/98. Ambos lotes fueron elaborados con promastigotes muertos y fragmentados de *L. (L.) amazonensis* (concentración de 40 µg/ml N₂ proteico).

Para cada persona se hizo una ficha numerada donde constan las informaciones como el número de identificación, nombre, edad, sexo, dirección, fecha de aplicación y lectura de la IDR y si hizo desplazamientos para zonas endémicas de leishmaniosis en los últimos años.

Además de la IDR, de algunas personas se recogió una muestra de sangre, en papel de filtro, para la realización de análisis serológicos a través de la técnica de ELISA.

IV.2. ESTUDIO CON LA POBLACIÓN CANINA

Los reservorios de la leishmaniosis en Santa Catarina son poco conocidos. En el oeste del estado ya se han notificado casos de leishmaniosis humana causada por *L. (L.) amazonensis* y *L. (V.) braziliensis* (Steindel y col., 1997; Grisard y col., 2000b). Los reservorios de estas especies son, habitualmente, cánidos, roedores y marsupiales.

Al iniciar un estudio epidemiológico en una zona es importante que se realice una buena elección del método de muestreo de la población. Un buen método es el muestreo exhaustivo que se basa en analizar todos los individuos enfermos y sanos. En este sentido, se intentó localizar el máximo posible de perros del municipio de Quilombo. En total se estudiaron, en dos etapas, 337 perros procedentes de 17 localidades, que corresponden a las mismas que se estudiaron para la población humana junto a otras adicionales (figura nº 6 página nº 36).

En las reuniones que se realizaron en las comunidades, se solicitó a la población que llevaran los perros a un local predeterminado, en los días y horarios combinados, para la toma de muestra. Muchos de los que no pudieron acudir con sus perros en el día marcado, se fue a su casa para la recogida de sangre de los animales.

En la primera etapa (enero y febrero/99) se recogieron muestras de animales de cinco localidades, a los cuales se realizaron los análisis serológicos. En la segunda etapa (octubre, noviembre, diciembre/99 enero y febrero/00), además de recoger muestras de animales de otras doce localidades, se buscó a los perros que fueron analizados en la primera etapa y que habían presentado en los análisis una tasa de anticuerpos, frente al antígeno de *Leishmania*, que superaba el umbral de positividad obtenido para la técnica de ELISA. De éstos, se recogieron muestras de ganglio poplíteo y aspirado de piel y/o lesiones (cuando presentes) para cultivo en medio NNN y Schneider. También, en ese periodo, se recogieron muestras para cultivo de algunos perros que presentaban signos compatibles con la leishmaniosis aún sin tener los resultados de la serología.

Para cada animal se hizo una ficha donde consta el número de identificación, nombre, edad, peso, sexo, tipo de pelo, nombre del propietario y el aspecto. Se observaron los animales que

presentaban algún signo clínico, especialmente las lesiones cutáneas, que hacían sospechar la presencia de leishmaniosis.

IV.3. ESTUDIO CON OTROS ANIMALES POSIBLES RESERVORIOS

Fueron analizados 17 roedores de la especie *Rattus rattus*, cuyas capturas se realizaron en los meses de enero y febrero de 1999. Los lugares donde se pusieron las trampas fueron: en el bosque cerca de las casas, en los gallineros, sótano de las casas y en los establos de vacas. Para obtener muestras de sangre de los animales silvestres, se solicitó la ayuda de los cazadores de la zona. Se distribuyeron diversos papeles de filtro Whatman n° 3, especiales para la recogida de muestras de sangre. De éstos se recogieron 5 muestras de sangre de animales conocidos por los cazadores como gambá o raposa, que posiblemente se trata de *Didelphis albiventris*.

Con la colaboración de un grupo de alumnos y profesores de la Facultad de Biología de la Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC), fue posible capturar 19 *Didelphis albiventris* en el interior del bosque secundario y en lugares cercanos a las casas en la región de Chapecó, zona muy cercana a la de Quilombo, cuya sangre fue también analizada.

IV.4. ESTUDIO CON LA POBLACIÓN DE FLEBOTOMINOS

El hábitat de los flebotominos es muy diverso, tanto en el periodo de reposo como en el de actividad de búsqueda de alimento. Esta diversidad de hábitats junto al diferente comportamiento de las especies y poblaciones de flebotominos, comporta que pueda producirse un importante sesgo o error en su muestreo. El error de muestreo se puede reducir incrementando el número de observaciones, como el aumento del número de trampas y la diversidad de técnicas de captura. La selección de los métodos de muestreo de flebotominos depende de los objetivos y alcance del estudio y de las especies que interesen (Young y Arias, 1992).

Para realizar un estudio de la diversidad de especies de una zona (muestreo cualitativo) es imprescindible que se utilicen distintas formas de captura. Cuando ya son conocidas las

especies de una zona se podrá elegir el/los mejores métodos de captura para realizar el muestreo cuantitativo y examinar la dinámica de poblaciones.

En este caso, como no se conocían las especies existentes en la zona ni tampoco la/s trampa/s de mejor eficacia, se utilizaron tres tipos: las trampas de papel adhesivo, Shannon y CDC.

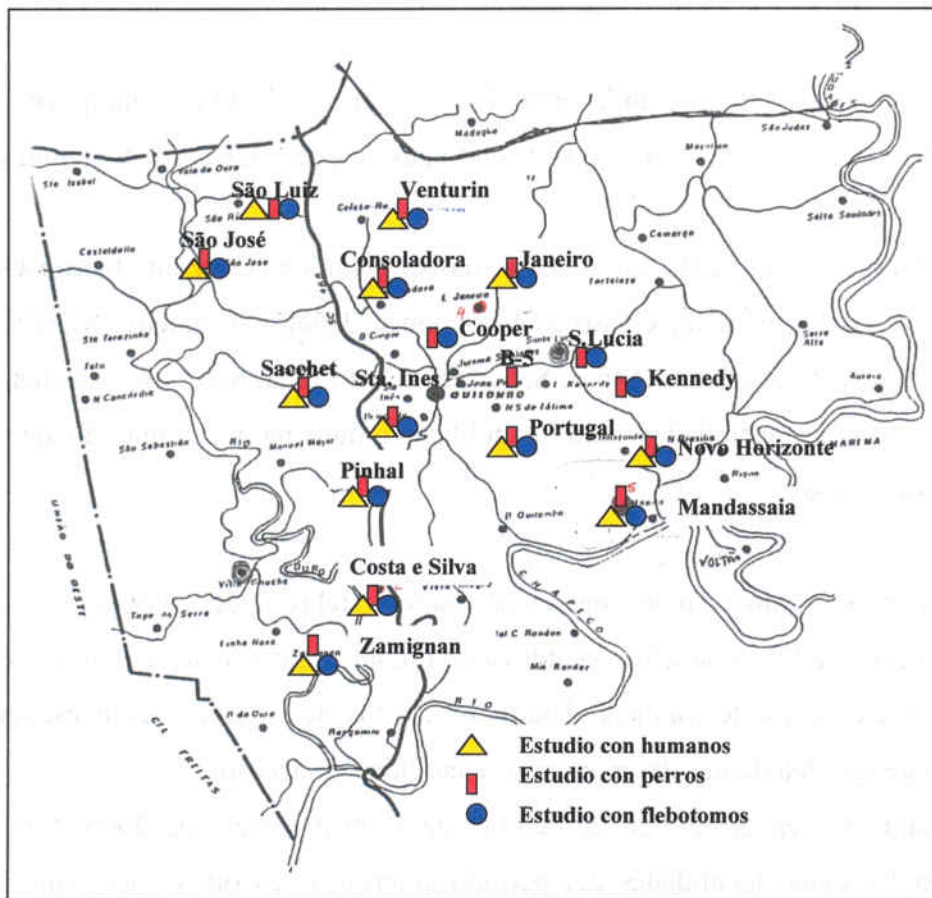
Para conocer las especies de flebotominos y su distribución en esa zona, fueron seleccionadas 16 localidades (Costa e Silva, Consoladora, Cooper, Janeiro, Kennedy, Mandassaia, Novo Horizonte, Pinhal, Portugal, Santa Ines, São José, Santa Lucia, São Luiz, Sacchet, Venturin y Zamignan), entre las estudiadas para la población humana y canina, donde se hicieron capturas en dos etapas:

a) La primera se realizó en los meses de enero y febrero de 1999, estudiándose cinco localidades (Costa e Silva, Janeiro, Mandassaia, Pinhal y Zamignan). Durante ese periodo se colocaron los tres tipos de trampas. Todos los puntos de captura fueron escogidos por su localización geográfica dentro del municipio y facilidad de acceso.

b) La segunda fue en el periodo de octubre de 1999 a febrero de 2000. Los estudios se siguieron en las cinco localidades del periodo anterior y las otras once, anteriormente ya citadas. En ese periodo se efectuó el estudio fenológico en dos localidades (Janeiro y Zamignan) con una periodicidad quincenal de colocación de las trampas. Además se efectuaron, también, dos capturas a lo largo de este periodo en otras 13 localidades con trampas de papel adhesivo y CDC (figura nº 6 página nº 36).

Durante todo el periodo de capturas, se colocaron algunas trampas esporádicas, en días y biotopos aleatorios, para obtener mayor numero de ejemplares y el posible aumento de la diversidad de especies.

Figura nº 6 – Mapa de Quilombo indicando los lugares de estudio con humanos, animales y flebotomos



IV.5. RECOGIDA DE MUESTRAS

IV.5.1. Muestras de sangre

IV.5.1.1. Humana

La recogida de sangre, para posterior análisis serológico, se hizo en personas voluntarias. Para ello se retiraron algunas gotas de sangre de la punta del dedo medio de la mano, que se desinfectó con algodón embebido en alcohol y con una aguja desechable (Glucolet 2–Bayer), se picó suavemente el dedo para permitir la salida de la sangre que fue recogida en papel de filtro Whatman nº 3, previamente identificado con el número, nombre y localidad.

IV.5.1.2. Canina

Para esto se utilizaron agujas desechables de 1,1 x 40 mm y de 0,9 x 25 mm, en perros de grande y pequeño porte, respectivamente, para retirar sangre de la vena cefálica de una de las patas delanteras. La sangre fue recogida en papel de filtro Whatman n° 3, de forma que la sangre traspasara bien el papel, para efectuar análisis serológicos. Los resultados obtenidos con la sangre colectada en papel de filtro son idénticos a los obtenidos con suero (Fisa y col., 1990 y Fisa y col., 1999). Las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente durante tres horas y después conservadas a una temperatura de -20°C (Guimarães y col., 1985; Portús y col., 1989; Seguí y col., 1990) hasta su utilización. Si la muestra es conservada a temperatura ambiente, mantiene su título serológico por, aproximadamente, 40 días y, pasados esos días, en función de la temperatura se observan modificaciones en los resultados (Seguí y col., 1990).

IV.5.1.3. Otros hospedadores

De *Rattus rattus*: a estos animales les fue realizada la eutanasia con éter y retirada de sangre del corazón, con pipeta Pasteur que fue recogida en papel de filtro Whatman n° 3, previamente identificado con el nombre y número del animal y fecha de captura. De *Didelphis albiventris*: se colocó en el papel los datos de identificación y se retiró sangre de la vena yugular, con una aguja desechable y, de la misma forma que se hizo con otros animales, impregnó la sangre en papel de filtro.

IV.5.2. Muestras para cultivo

IV.5.2.1. Punción ganglionar (ganglio poplíteo)

Se utilizó esta forma por ser una técnica sencilla y de fácil obtención de resultados (Rioux y col., 1968; Lanotte y col., 1977). Sin embargo, el rendimiento de las muestras varia dependiendo de la clínica y grado de diseminación del parásito en el animal y la experiencia del operador (Portús, 1997). Para la realización de esta actividad se colocó el animal en posición de decúbito lateral. Cuando fue necesario, se raspó el pelo con una máquina de cortar pelo y se desinfectó la zona con alcohol de 70°. Se localizó el ganglio poplíteo comprimiéndolo con los dedos. Con una jeringa estéril de 5 mm, conteniendo 1 ml de solución salina y 25000 UI de penicilina, se buscó el ganglio, realizando varios movimientos rotatorios y se procedió a la aspiración del líquido ganglionar.

IV.5.2.2. Aspirado cutáneo

En lo que respecta a la posición del animal, el contenido de la aguja, y la asepsia se procedió de la misma manera que para la punción ganglionar. Se perforó la piel y después de hacer varios movimientos rotatorios suaves, con objeto de disgregar el tejido y facilitar el aspirado, se retiró el material. Cuando se hizo este aspirado en lesión, se colocó la aguja en el borde de la misma para obtención de la muestra.

IV.6. TRAMPAS UTILIZADAS

IV.6.1. Para captura de flebotominos

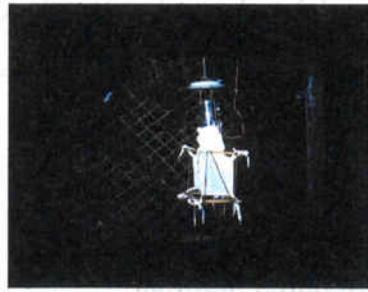
Al ser desconocida la fauna de flebotominos y, por lo tanto, también los mejores métodos de captura, se utilizaron tres tipos de trampas: papel adhesivo, las luminosas tipo CDC y Shannon. Los dos primeros se utilizan de forma rutinaria en Europa y Africa y los dos últimos en América del Sur.

Figura nº 7 - Trampas utilizadas para captura de flebotominos

Papel adhesivo

CDC

Shannon



IV.6.1.1. Trampas de papel adhesivo

Estas trampas consisten en papeles blanco mate de 20 X 20 cm, untados con aceite de ricino medicinal, que facilita la adhesión de los flebotominos al dirigirse o salir de sus lugares de reposo.

Las estaciones de captura con este tipo de trampa fueron las mismas escogidas para las capturas con las trampas CDC. Los puntos de muestreo fueron agujeros de arboles, muros, fisuras en paredes, establos de vacas y cerdos, gallineros y otros puntos sospechosos. Se

colocaron las trampas en los locales escogidos y se dejaron siete días. Los papeles se recogieron agrupados por estación y envueltos en papel sulfurado para su conservación. Los paquetes fueron identificados con el nombre de la estación, fechas de colocación y recogida y el número de papeles. Se conservaron de esta manera hasta la recogida de los flebotominos.

IV.6.1.2. Captura con trampas luminosas tipo CDC

Es una trampa que contiene una pequeña lámpara y un aspirador que funcionan conectados a una batería. A la trampa se le acopla una bolsa de tul. Los flebotominos son atraídos desde lugares cercanos por la luz y el ventilador que los arrastra hacia la bolsa. Se colocan al anochecer y se recogen el otro día al amanecer.

Se han escogido distintos lugares para la captura con estas trampas. En bosques, dentro y fuera de pocilgas y gallineros, junto a establos de vacas, cerca de locales donde duermen los perros o bien otros en los que los flebotominos podrían buscar alimento o reposar.

IV.6.1.3. Trampa Shannon

Esta trampa consiste en una bolsa blanca en forma de rectángulo abierta por la parte inferior que se queda en el suelo y mide cerca de 1,0 X 1,5 m. La parte superior presenta una visera de unos 30 cm donde, normalmente se pueden poner los flebotominos. Dentro se cuelga una linterna con lámpara fluorescente. La trampa se amarra con cuerdas a arboles de forma que quede bien extendida. Los flebotominos son atraídos por la luz y por las personas que van a efectuar la recogida con capturadores manuales. Se monta la trampa al oscurecer y se deja algunas horas hasta que se perciba que no se atraen flebotominos. Esta trampa se ha puesto dentro del bosque o en lugares próximos, cerca de establos de vacas, pocilgas y gallineros.

IV.6.2. Captura de roedores y animales silvestres

Para la captura de roedores en vivo, se pusieron trampas del tipo Sherman con cebo de queso y "bacon" distribuidas por bosques, sótanos de las casas, gallineros, y establos.

La captura de *Didelphis albiventris* se realizaron con trampas tipo "live-trap" TRAP 132 (47x20x18 cm) marca Beiramar, (figura nº 8) cuyos animales se atrajeron con plátano y

“bacon”. Referidas trampas se colocaron en el bosque, en lugares cercanos a gallineros y las casas de los agricultores.

Figura n° 8 – Trampa tipo “live-trap “ utilizada para la captura de *Didelphis*



IV.7. TÉCNICAS UTILIZADAS

IV.7.1. EL ELISA

Muchos autores han descrito la técnica de ELISA para su utilización en el serodiagnóstico de la leishmaniosis, como Hommel y col. (1978), Ho y col. (1983), El Amin y col. (1985), Badaró y col. (1986), Evans y col. (1990), Follador y col. (1999) y Brito (1999). En este trabajo se utilizó la técnica puesta a punto por Torras (1993) en el laboratorio de Parasitología de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona.

Fueron utilizadas placas de poliestireno de 96 pocillos (Costar, ref. 3590). Esta placa adsorbe la proteína por unión física directa. En este proceso se forma una monocapa de proteína, unida hidrofólicamente a un número limitante de lugares activos de la superficie que está en equilibrio con las moléculas de proteínas libres del sobrenadante. Los factores fisicoquímicos que intervienen en la adsorción a la fase sólida son el pH, la temperatura, el tiempo de incubación y la fuerza iónica del tampón.

IV.7.1.1. El antígeno

Como antígeno se utilizó el producto resultante del sonificado de un cultivo de promastigotes de la cepa de referencia de *L. (L.) infantum* (MHOM/FR/78/LEM-75, zimodema MON-1). Éste fue fijado en la placa a una concentración de 20 µg de proteína/ml.

IV.7.1.2. Preparación del antígeno

En un frasco de cultivo celular de 200 ml, se colocó 50 ml del medio de cultivo Schneider más un 20% de Suero Bovino Fetal y a él se añadió 10 ml de un cultivo de *Leishmania* en medio Schneider recogido en fase de crecimiento exponencial, con una concentración aproximada de 2×10^6 promastigotes por ml. Se colocó en la estufa a 26 °C durante cuatro días. Cuando crecieron los cultivos, se traspasaron a tubos “falcon” y se centrifugaron por 10 minutos a 2500 r.p.m. y a 4°C (centrífuga refrigerada Heraeus). Se decantó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió con 40 ml de PBS (anexo nº 1) estéril, volviéndose a centrifugar en las mismas condiciones anteriores. Se repitieron los lavados por tres veces. El último sedimento se resuspendió con 10 ml de PBS y se colocó en un tubo de vidrio sumergido en hielo. A continuación se hizo seis ciclos de sonicación de 30 segundos y se observó al microscopio para ver si los promastigotes se habían roto.

IV.7.1.3. Sensibilización de la placa de poliestireno

Se descongeló el antígeno previamente preparado y se resuspendió con el “mixer”. En un vial con 1 ml de antígeno, se añadieron 50 ml de tampón carbonato-bicarbonato pH 9,6 y se removió muy bien para evitar la sedimentación. Con una pipeta multicanal se distribuyeron 100 µl de la suspensión antigénica a todos los pocillos. La placa se envolvió en papel de aluminio y se dejó una noche en nevera a 4°C. Al día siguiente se desechó enérgicamente el contenido de la placa y se la dejó secar a temperatura ambiente durante una hora. Las placas se guardaron envueltas en papel de aluminio a -40°C hasta su utilización.

IV.7.1.4. Adición de las muestras

a) ELISA a partir de suero - Se hizo una dilución previa de los sueros problema y control, al 1/10 en PBS-Tween-Leche (PBS-T-L-1%, anexo nº 1). En la placa se colocaron, en cada pocillo, 200 µl de PBS-T-L y se añadieron 20 µl del suero correspondiente para obtener la dilución 1/100. Todos los sueros se procesaron por duplicado en la misma placa. Se incubó durante una hora y media a 37°C, en cámara húmeda. Después de la incubación se hicieron cuatro lavados de cinco minutos cada uno, siendo tres veces con solución salina-tween y una vez con solución salina.

b) ELISA a partir de papel de filtro - Las muestras de sangre obtenidas en papel de filtro se utilizaron para el diagnóstico a través de la técnica de ELISA ya descrita anteriormente. Para la realización de esa técnica a partir del papel de filtro se las eluyó en tampón PBS-T-L al 1%. Se cortó el papel con la parte impregnada de sangre con un perforador. Se calcula que a un círculo de 6 mm de diámetro le corresponden 5 μ l de sangre. A cada círculo de papel se le añadieron 250 μ l de tampón para obtener la dilución de trabajo que es de 1/100 (Fisa, 1992 y Fisa y col, 1997).

IV.7.1.5. Adición del conjugado enzimático

Se utilizó la Proteína A marcada con peroxidasa (PA-PO) que se une a las moléculas de inmunoglobulinas sin interferir en los sitios de unión del antígeno, permitiendo la formación de complejos terciarios constituidos de antígeno, anticuerpo y proteína A. La proteína A es un polipéptido de 42 kD, originalmente aislado de *Staphylococcus aureus* (cepa Cowan I). Dependiendo de las condiciones iónicas, la especie animal, la clase y subclase de inmunoglobulina, la proteína A tiene afinidad, como mínimo en dos puntos, por el fragmento Fc, de muchas IgG de distintos animales (Goding, 1978). Esa proteína conjugada con Peroxidasa puede ser utilizada frente a varias especies animales obteniendo fuerte afinidad, como se observa en la tabla nº 4.

La Proteína A fue diluida al 1/30000 en PBS-T-L-1%. Se colocaron 100 μ l en cada pocillo y se dejó incubar por una hora y media a 37°C, en cámara húmeda. Tras la incubación, se desechó enérgicamente el contenido de la placa y se hicieron cuatro lavados de cinco minutos: tres con solución salina - tween y una con solución salina.

Tabla n° 4 - Reactividad de la proteína A frente a las IgG de diferentes especies animales

Especies	Unión		
	Fuerte	Débil	No reacciona
Hombre ^b	<i>IgG1,2,4</i>		IgG3
Mono	IgG3 subclases		
Conejo	IgG		
Vaca	IgG1		IgG2
Cerdo ^b	IgG		
Oveja	IgG2		IgG1
Cabra	IgG2	IgG1	
Perro ^b	IgG		
Rata ^b	IgG1,2 ^c	IgG2 ^b	IgG2 ^a
Ratón	IgG2 ^a ,2 ^b	<i>IgG1</i>	
Hamster	IgG1	<i>IgG2</i>	
Cobayo	IgG1		
Pájaros	IgG1,2		IgY

Tomado de Tijssen, 1986.

^a Las subclases en itálica representan las IgG mayoritarias

^b Otras clases de inmunoglobulinas también pueden unirse

^c Unión fuerte: IgG que eluye en una columna de Sepharosa-Proteína A pH < 6.0. Unión débil: IgG que eluye a pH > 6.0

IV.7.1.6. Adición del sustrato

Como sustrato se utilizó el orto-fenilendiamina dihidroclorhidrato (OPD) 200 µl en cada pocillo. Después de esto se dejó incubar en cámara húmeda, durante 20 minutos. La reacción enzimática se paró con 50 µl de H₂SO₄ 3M por pocillo.

IV.7.1.7. Lectura

La lectura se realizó en un espectrofotómetro (Titertek Multiskan Plus MK II) a la longitud de onda de 492 nm.

IV.7.1.8. Valoración de los resultados

La valoración de los resultados se hizo en Unidades (U) de acuerdo con la Densidad Óptica (DO) del suero calibrador que está valorado en 100 U. La seropositividad se calculó relacionando la DO obtenida del suero problema con la DO obtenida, a la misma dilución del suero calibrador, utilizando la fórmula:

$$U = \frac{\text{DO suero problema}}{\text{DO calibrador}} \times 100$$

Los criterios de positividad se han establecidos de forma que se consideraron negativos los sueros con una positividad inferior a la media más tres veces la desviación estándar de la población negativa y positivos a los que superaron estos valores.

IV.7.2. El *Western Blot*

El *Western Blot* es una técnica ampliamente utilizada para el diagnóstico indirecto de esa enfermedad pues detecta anticuerpos anti-*Leishmania* con muy buena sensibilidad y especificidad (Bogdan y col., 1990). Entre otros autores, fue utilizada por Masuda y col. (1989) Chiller y col. (1990), Malchiodi y col. (1994), Cardeñosa (1995), Vexenat y col. (1996), Aisa (1997), Aisa y col. (1998), Agudelo (1999) y Brito (1999). Es una técnica inmunoenzimática en que se separan las proteínas de una muestra de suero pudiendo verificar los anticuerpos específicos de cada una de las fracciones antigénicas.

IV.7.2.1. Preparación del antígeno

El proceso seguido para la obtención del antígeno en lo que se refiere al medio de cultivo, la cepa de referencia y el cultivo de los promastigotes, es similar al ya descrito para la obtención del antígeno de ELISA, con algunas diferencias en la finalización del proceso. Después del último lavado se resuspendió el sedimento de promastigotes y se hizo un conteo de células en una cámara de Fuchs-Rosenthal. Se resuspendió en el tampón de muestra (anexo nº 1) a fin de favorecer la lisis celular para que la concentración final fuera de 300×10^6 promastigotes/ml, lo que corresponde a 1 mg de proteína/ml.

IV.7.2.2. Preparación de los geles de poliacrilamida

Los geles se montaron en el sistema de electroforesis vertical Mini-Gel AE 6400 Dual Mini Slab Kit (ATTO). La concentración de poliacrilamida se hizo al 15% obtenida a partir de una solución madre de bis-acrilamida (30%) y acrilamida (0,8%), diluida en agua destilada (anexo nº 1). Se montó el sistema de electroforesis como recomienda la casa comercial, se agregaron 5,5 ml del gel separador (anexo nº 1) y se dejó polimerizar a temperatura ambiente durante 30 minutos. El contacto del gel separador con el oxígeno del aire puede impedir la

polimerización. Por esto, encima del separador se añadió agua destilada que, posteriormente, y antes de poner el apilador, se eliminó y los vidrios fueron secados con papel de filtro. Después de la polimerización se agregó el apilador (anexo n° 1) al 4,5% de poliacrilamida e inmediatamente se colocaron los peines y se dejó polimerizar a temperatura ambiente durante 30 minutos.

IV.7.2.3. Electroforesis

Se realizó el montaje de los vidrios en la cubeta conforme recomienda la casa comercial ATTO. Se colocó el tampón de electroforesis (anexo n° 1) hasta la altura de poder cubrir el electrodo superior.

Tanto el antígeno como el standard (SDS-PAGE Molecular Weight Standard, Low Range, n° 72135), cuyos pesos moleculares van de 97,2 kD de la fosforilasa hasta 14,4 kD de la lisozima, se hirvieron durante cinco minutos sin descongelación previa. Se quitaron los peines del gel y se colocaron 5 μ l de standard de pesos moleculares en cada uno de los pocillos pequeños y 150 μ l de proteína antigénica en el canal grande, lo que corresponde a 150 μ g de proteína.

Se conectó a la fuente a 50V y se dejó hasta que el frente pasara el apilador. A partir de ese momento, se pasó a 100V y cuando el frente de migración llegó a menos de 1 cm del final del gel, se desconectó la fuente. Este proceso lleva cerca de dos horas.

IV.7.2.4. Transferencia para las membranas de nitrocelulosa (NC)

Antes de hacer la transferencia se midió el frente, que es la distancia que hay entre la línea de interfase hasta donde haya migrado el antígeno. A continuación, se sumergieron las membranas (Millipore 0,45 μ l) juntamente con cuatro papeles de filtro (filter paper backing; BIO RAD) y las esponjas (tipo "scotch brite") en tampón de transferencia (anexo n° 1), durante 20 minutos. Entre dos placas de plexiglás se hizo un "sandwich" poniendo en este orden, a partir de la parte blanca: una esponja, el papel de filtro, la NC, el gel, el papel de filtro y la esponja. Todo esto, sin que quedasen burbujas de aire entre el gel y la membrana. Se colocó en la cubeta de transferencia (Mini Trans Blot Electrophoretic Transfer Cell, BIO RAD), sumergido en tampón de transferencia y un acumulador de frío. Se conectó a la fuente

(Constant Voltage Power Supply, Model 200/2.0 BIO RAD) a 100V (inicio 0,21 A y al máximo 0,34 A finales) durante unas dos horas. El proceso se realizó en nevera. Después de terminada la transferencia se bloquearon las membranas con tampón TS-leche 5% (anexo nº 1), durante una noche en nevera a 4°C. Las membranas se guardaron a -20°C envueltas en papel de aluminio.

IV.7.2.5. Inmunoblot

Se descongelaron las membranas de NC y se lavaron con TS 20 mM (anexo nº 1) durante 10 minutos. Se cortaron en tiras de 3 mm de ancho y se pusieron en el aparato Mini Incubation Trays BIO RAD. En cada canal se colocaron 500 µl de los sueros problema y controles, diluidos a 1/50 con TST-leche al 1% y se incubó durante 2 horas a 37°C con agitación de 75 r.p.m. Al finalizar la incubación se hicieron tres lavados con TST (anexo nº 1) de cinco minutos cada uno. A continuación se añadieron 500 µl del conjugado Proteína A Peroxidasa (SIGMA) en cada pocillo, a una dilución de 1/1000 en TST-leche al 1% y se incubó durante una hora a 37°C. Después de incubado se realizaron tres lavados con TST de cinco minutos cada uno y uno con TS 500 mM y se reveló con 4-cloro1naftol-metanol (anexo 1), añadido de 5 µl de H₂O₂. Se colocó a incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente hasta que aparecieron las bandas. Para frenar la reacción se lavó con agua del grifo. La parte de la membrana correspondiente al standard se cortó para hacer el revelado con avidina peroxidasa (anexo 1).

IV.7.2.6. Determinación del peso molecular de las bandas

El peso molecular se obtuvo a partir del cálculo de la R_f (movilidad relativa, que es la distancia que hay desde el apilador hasta la banda dividido por el frente) de cada una de las bandas y se extrapoló a la curva semilogarítmica obtenida a partir de los pesos moleculares del standard.

IV.7.3. Análisis parasitológico

El cultivo de la muestra de punción ganglionar, piel y lesión, se hace para lograr aislar la *Leishmania* y posteriormente identificarla. Inicialmente se utilizó el NNN (Novy, McNeal, Nicolle, anexo nº 1). De cada uno de los perros que fueron pinchados se colocó el aspirado en un tubo de ese medio de cultivo y se dejó incubar, inicialmente en el campo a temperatura

ambiente y después en una cámara a 24°C. Después de incubado, a los siete días, se recogió una gota de la fase líquida, que es donde crecen los parásitos, y se la colocó entre un portaobjeto y un cubre y se examinó al microscopio. Después de siete días se inoculó en otros tubos hasta la cuarta resiembra, en que se puede considerar el cultivo sea negativo. También se hicieron cultivos en medio de Schneider (anexo nº 1), a partir del NNN, que se conservaron hasta cuatro meses, analizándolos al microscopio dos veces a la semana.

IV.7.4. Test de hipersensibilidad retardada o intradermorreacción de Montenegro (IDR)

Para la realización del test de hipersensibilidad retardada, se aplicó la leishmanina a todas las personas voluntarias, de forma intradérmica, inyectando 0,1 ml del antígeno de Montenegro en la parte interior del antebrazo o exterior del brazo, utilizando una jeringa desechable de 1 ml. Pasadas 48 horas se realizó la lectura utilizando la técnica del bolígrafo. Fueron consideradas positivas las reacciones mayores o iguales a 7 mm de diámetro.

IV.7.5. Recogida y montaje de los flebotominos

La recogida de los ejemplares vivos de las trampas CDC se hizo con un aspirador eléctrico (Entomopraxis, ref. D-702). Se dejaron los flebotominos por cinco minutos en el congelador para que se murieran. Después se los puso en alcohol de 70°, así como también, los ejemplares muertos, permaneciendo allí hasta proceder el montaje. Los flebotominos capturados con trampas de papel adhesivo, se recogieron con un pincel y se colocaron en alcohol de 95°. Pasados unos días, se cambió a alcohol de 70°.

El montaje se efectuó con el líquido de Hoyer. Es un proceso rápido y permite la clarificación del flebotomino. En un portaobjetos se pone una gota del líquido de Hoyer y bajo una lupa, se asienta el flebotomino en posición lateral de forma que las extremidades queden bien visibles. La cabeza se corta y se pone en posición dorso-ventral. Se coloca el cubre objetos y se deja secar durante 12 h en una placa calefactora de 45 °C y después, durante una semana en una estufa a 60 °C.

La identificación se basa en las características morfológicas y se siguió, fundamentalmente, las claves de identificación sugeridas por Barretto (1950), Lucena (1953), Fraiha Neto y col. (1970), Young y Duncan (1994), Marcondes (1996) y Marcondes y col. (1998a).

V. RESULTADOS

V. RESULTADOS

V.1. ESTUDIO DE LOS SUEROS DEL BANCO DE SANGRE DE CHAPECÓ

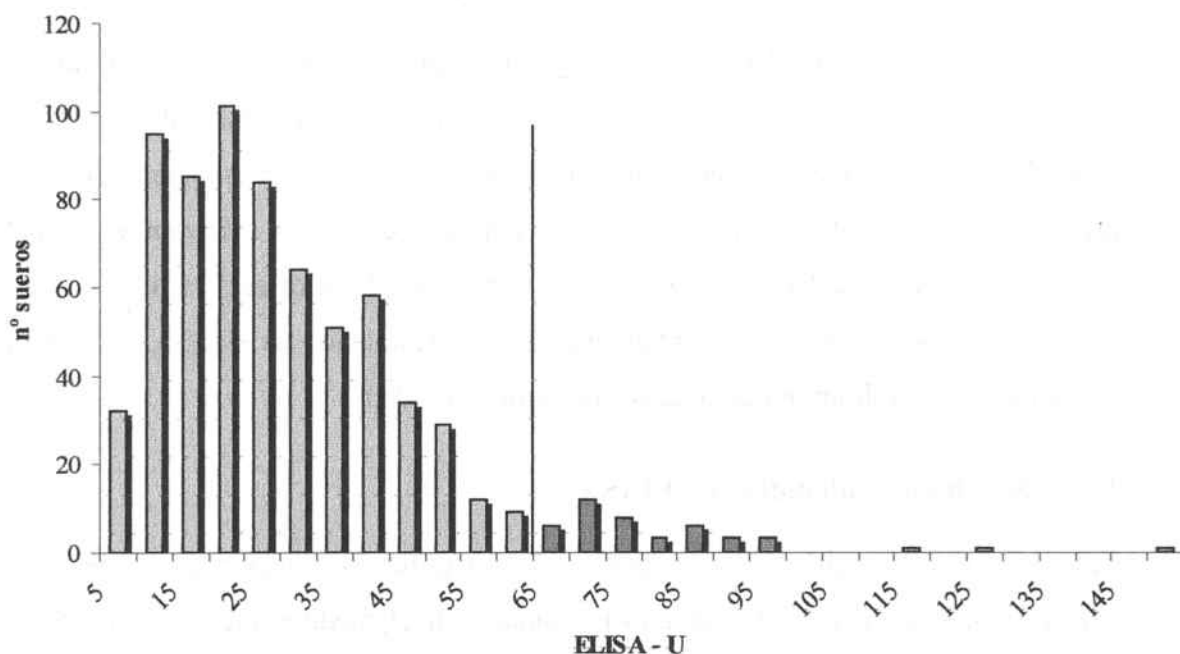
Se analizaron 671 sueros del banco de sangre de Chapecó, a los que se determinó la presencia de anticuerpos específicos frente a *Leishmania* a través de la técnica de ELISA y *Western Blot*. De los resultados obtenidos en cada placa de ELISA se escogieron los sueros que presentaron mayor seropositividad frente al antígeno de *L. (L.) infantum* y se analizaron a través de la técnica de *Western Blot*, a fin de determinar la serorreactividad frente al antígeno de *L.(L.) infantum*. Con esto, juntamente con los resultados de ELISA, se conocerían los municipios que podrían presentar casos de seropositividad.

V.1.1. Resultados obtenidos con ELISA

Teniendo en cuenta que si bien la técnica ELISA utilizada está perfectamente estandarizada para el diagnóstico de la leishmaniosis humana en el mediterráneo, no lo está para otras especies de *Leishmania*, por lo que el umbral de positividad de la técnica se determinó de nuevo.

En el histograma de frecuencias (figura nº 9) se observa que la distribución de los títulos obtenidos está representada por una curva bimodal, tal como ocurre, habitualmente, en la distribución de los títulos serológicos de una enfermedad infecciosa en zona endémica. El punto de inflexión de esta curva representa el punto de corte que separa la población positiva de la negativa, por lo que se consideró que el umbral de positividad de la técnica empleada podía establecerse en las 66 U.

Figura n° 9 - Títulos de anticuerpos específicos de *Leishmania* en los sueros humanos estudiados procedentes del banco de sangre de Chapecó



Este umbral de positividad coincide también con la media más tres veces la desviación estándar de la población estudiada, después de haber eliminado los valores excedentes. De esta manera, se considera como población normal seronegativa, aquella con valores de ELISA menores que la media más tres veces la desviación estándar y población seropositiva, aquella que exceda dicho valor. Tomando, por lo tanto, 66 U como umbral de positividad, el 4,5% de los sueros estudiados fueron positivos. La distribución por municipio del número de sueros y los respectivos seropositivos se indica en la tabla n° 5 y los valores individuales de cada suero, se representan en el anexo n° 2.

Tabla nº 5 - Distribución, por municipio, de los sueros del banco de sangre de Chapecó que presentaron anticuerpos específicos frente a *Leishmania*.

Municipio*	Seropositivos** ELISA	Total sueros analizados
Caibi	0	2
Campoerê	0	3
Chapecó	1	82
Descanso	6	39
Guaraciaba	0	20
Hospital Regional	12	380
Itapiranga	0	13
Iporã D'Oeste	1	6
Maravilha	0	27
Palmitos	0	2
Quilombo	3	3
Saudades	1	11
São Carlos	0	7
São Lourenço	0	6
São Miguel	0	6
Tunápolis	0	1
Xanxerê	5	58
Xaxim	1	5
Total	30	671

* Los sueros proporcionados por el banco de sangre de Chapecó, están identificados por el municipio de procedencia. Todavía, por cuestiones éticas y legales del propio banco de sangre, una gran parte de ellos tienen la denominación de procedencia como "Hospital Regional". Después de obtener los resultados, de algunos de ellos se ha podido conocer el municipio de origen de los sueros que habían presentado positividad los cuales se identificaban por Hospital Regional.

** Número de sueros que presentaron títulos igual o superior a las 66 U.

Omitimos realizar una comparación de frecuencias entre los diferentes municipios, ya que de la mayor parte de los donantes se desconoce la procedencia exacta y están incluidos en "Hospital Regional". Existe además, un notable sesgo de muestreo ya que, en muchos casos, solo se confirmó la procedencia de los que fueron positivos, tal es el caso de los sueros procedentes de Quilombo.

V.1.2. Resultados obtenidos en *Western Blot*

De los sueros analizados por ELISA, a 135 de ellos se analizó por *Western Blot* utilizando minigeles al 15% de poliacrilamida para la separación electroforética de los polipéptidos. La reactividad de los sueros frente a las fracciones proteicas de *Leishmania (L.) infantum* apareció en el 68,9% de ellos. Los polipéptidos del antígeno de *Leishmania (L.) infantum* que

reaccionaron con más del 15% de los 135 sueros analizados por *Western Blot* fueron: 48 kD (18,5%), 53 kD (17,7%), 55 kD (22,2%), 58 kD (21,4%) y 71 kD (15,5%).

La distribución por municipio del número de sueros que presentaron ninguna, una o más bandas, están representadas en la tabla nº 6 y los valores individuales de cada suero se representan en el anexo nº 2.

Por tratarse de sueros oriundos de un banco de sangre, y que por esto se supone ser procedentes de individuos sanos, es importante resaltar el número de bandas que se detectaron en ellos.

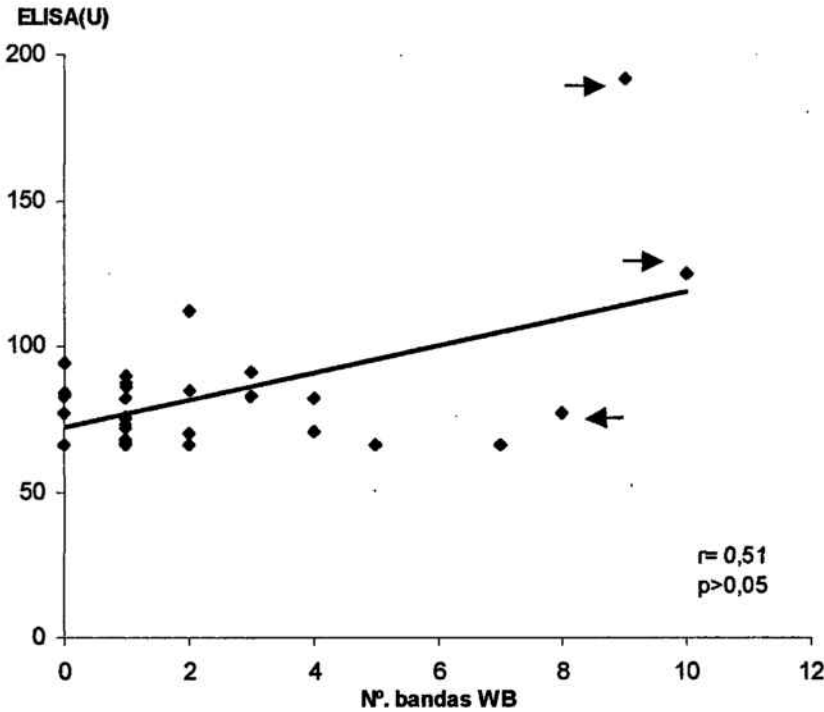
Tabla nº 6 – Distribución, por municipio, del número de sueros y su respectivo número de bandas obtenidas en *Western Blot*

Municipio	Nº de Bandas							Nº sueros
	0	1	2	3	4	5	≥7	
Caíbi	1	0	0	0	0	0	0	1
Campoerê	0	0	0	0	0	0	1	1
Chapecó	6	2	2	2	1	1	1	15
Descanso	2	7	2	1	2	0	0	14
Guaraciaba	1	1	0	0	0	0	0	2
Hospital Regional	25	9	13	3	5	2	0	57
Itapiranga	0	1	2	1	1	0	0	5
Iporã D'Oeste	0	3	1	1	0	1	0	6
Maravilha	0	3	2	0	0	0	0	5
Palmitos	1	0	0	0	0	0	0	1
Quilombo	0	0	0	0	0	0	3	3
Saudades	2	1	0	0	0	0	0	3
São Carlos	0	1	0	0	0	0	0	1
São Lourenço	1	1	0	0	0	0	0	2
São Miguel	0	0	1	1	0	0	0	2
Tunápolis	1	0	0	0	0	0	0	1
Xanxerê	4	4	4	2	0	0	0	14
Xaxim	0	0	1	1	0	0	0	2

Como se mencionó anteriormente, el punto de inflexión entre la población positiva y negativa obtenido en el estudio de estos sueros a través del ELISA, fue establecido en 66 U. La gran mayoría de los sueros que en el ELISA obtuvo el valor igual o superior a las 66 U, también presentó bandas en *Western Blot*.

Al relacionar los resultados en ELISA y el número de bandas en *Western Blot*, no se observa un incremento paralelo entre los parámetros en aquellos sueros que fueron moderadamente positivos (ELISA ≤ 100 U) (figura n° 10)

Figura n° 10 - Relación entre la positividad del ELISA y el número de bandas reveladas en el *Western Blot*.



→ Se señala en la figura los resultados obtenidos con los sueros de Quilombo.

Al determinar la procedencia de los que dieron mayor positividad serológica, bien fuera por los valores cuantitativos obtenidos en ELISA, como por el número de bandas y la intensidad de las mismas, reveladas mediante *Western Blot*, se vio que varios de ellos procedían del municipio de Quilombo. Es también en este municipio donde se había detectado, con anterioridad, casos de leishmaniosis cutánea, por lo que se decidió centrar los estudios posteriores en esta zona.

V.2. ESTUDIO DE LA LEISHMANIOSIS EN LA POBLACIÓN HUMANA DE QUILOMBO

V.2.1. Test de la intradermorreacción de Montenegro (IDR)

V.2.1.2. Descripción de la población estudiada

La gran mayoría de la población del municipio que se presentó como voluntaria para el estudio vive en zona rural, trabaja en el campo y tiene animales cerca de casa, como perros, gallinas, gatos, caballos, cerdos y vacas. La presencia de insectos como moscas y mosquitos es muy frecuente, especialmente en el verano. Pocas familias utilizan mallas anti-mosquitos en las puertas y ventanas o mosquiteras para dormir. Sin embargo, en las pocilgas, establos y gallineros son usados, frecuentemente, productos químicos para matar larvas e insectos.

Se sometieron al test de la IDR un total de 450 personas, pertenecientes a trece localidades, de edades comprendidas entre 1 y 83 años. De éstas, 232 del sexo femenino y 218 masculino. Se pudo realizar la lectura en 444 personas (98,6%). A 148 de ellas se recogió muestras de sangre en papel de filtro Whatman nº 3, con el objeto de aplicar los tests de ELISA y *Western Blot*. Todos firmaron una declaración de autorización para la realización de los tests (anexo nº 6), como recomienda el Comité de Ética del Ministerio de Salud de Brasil. Hay que resaltar que en todas las comunidades hubo una aceptación muy buena del trabajo. Sin embargo, en dos de ellas, algunas personas no se sometieron al test por cuestiones religiosas.

A todas las personas se verificó si presentaban lesiones o cicatrices sospechosas de leishmaniosis cutánea. En ninguna de ellas se observó lesiones activas. Sin embargo, se pudieron ver diversas personas que presentaban cicatrices.

V.2.1.2. Resultados globales de la IDR

Los resultados individualizados, obtenidos por un lado con la técnica de ELISA y por otro, de la aplicación de la intradermorreacción, juntamente con los datos de las personas a las que se realizó el test, están en el anexo nº 3.

La OMS propone que se considere positiva la intradermorreacción cuando la induración obtiene una medida igual o mayor a cinco milímetros. En la zona de nuestro estudio hubo un alto número de personas que presentaron reacción al antígeno utilizado. En vista de esto, pensamos que podríamos ser más restrictivos indicando como positiva la reacción mayor o igual a siete milímetros, considerándose lo siguiente:

a) Los valores de corte para un parámetro biológico, no son nunca valores absolutos válidos para cualquier grupo de población y en cualquier circunstancia de realización de un ensayo.

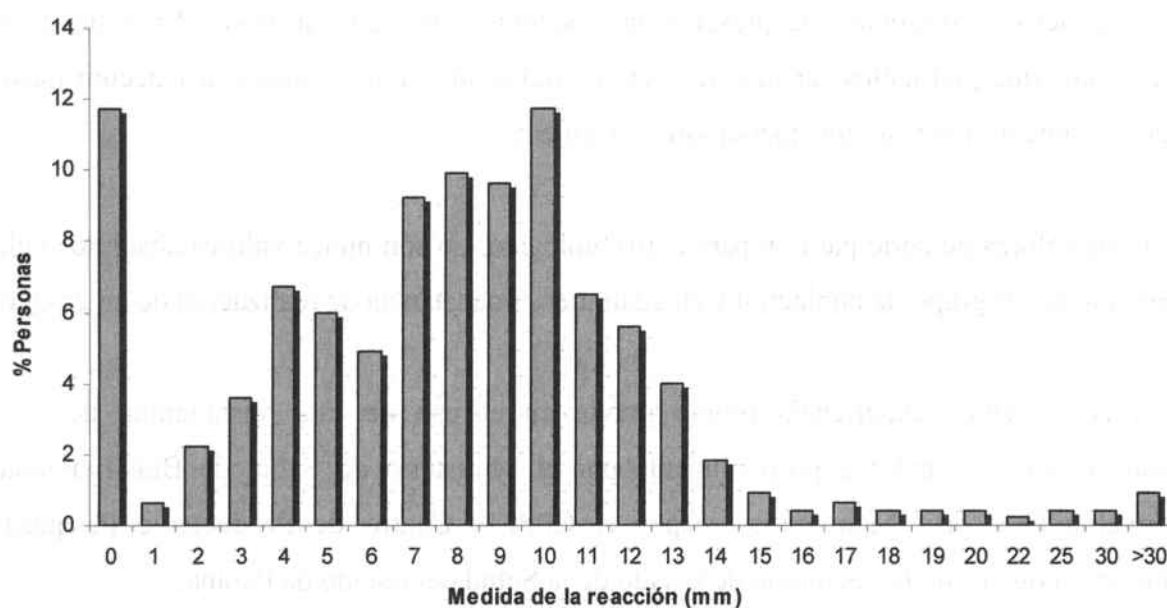
b) No tenemos experiencia propia previa en el uso de esta leishmanina de *L. (L.) amazonensis*, la cual fue proporcionada por el Ministerio de Salud de Brasil, Fundação Oswaldo Cruz, Bio-Manguinhos y por el CPPI – Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos de la Secretaría de Estado de la Salud del Estado de Paraná.

c) No hay datos de estudios anteriores en la región, sino el trabajo de São Thiago & Guida (1990), que realizó intradermorreacción de Montenegro en trece personas residentes en Quilombo y en el municipio vecino de Coronel Freitas (20 km de distancia).

d) Al medir las reacciones, es difícil precisar con exactitud las medidas de las induraciones, lo que nos hizo considerar como dudosas las que obtuvieron cinco y seis milímetros.

Tomando como umbral de positividad los 7mm de diámetro, los resultados de la aplicación de la IDR en la población estudiada, presentaron un 63,9% de positividad. Las medidas de las reacciones variaron de cero a cuarenta milímetros. Un total de 52 personas (11,7%) no tuvieron ninguna reacción frente a la leishmanina. Entre las personas en que se observó induración, el mayor número obtuvo medida entre siete y diez milímetros. Es importante resaltar que cinco de ellas presentaron reacciones superiores a 25 mm (figura nº 11).

Figura n° 11 – Histograma de frecuencias de la medida de las reacciones obtenidas en el test de hipersensibilidad retardada



V.2.1.3. Resultados según el sexo y la edad

Al analizar la positividad obtenida entre la población masculina y femenina, no se detectó diferencia estadística entre los grupos, conforme se indica en la tabla n° 7.

Tabla n° 7 – Resultados de la IDR según el sexo de la población estudiada

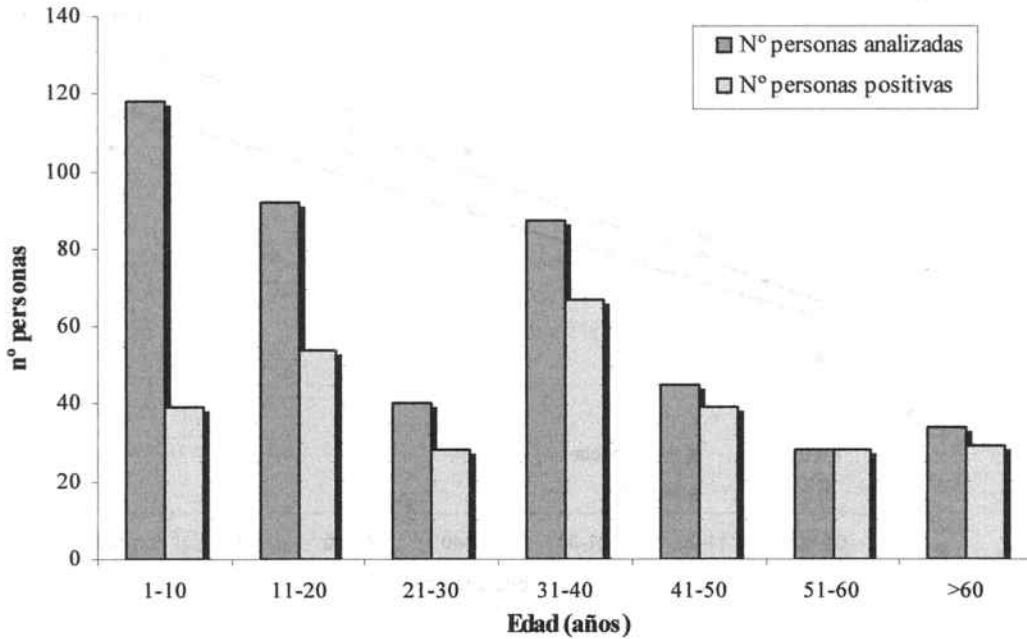
	N°	P (%)
Masculino	215	62,7
Femenino	229	65

$\chi^2=0,25; p>0,05$

N° - número de personas analizadas
P(%) – prevalencia (IDR positivos)

En la figura n° 12, se indica la distribución de la población analizada, bien como el número de personas a que se realizó el test, en cada grupo de edad, y la positividad obtenida.

Figura n° 12 - Distribución de la población estudiada mediante IDR y número de personas positivas en cada grupo de edad



En los distintos grupos de edad se observa un incremento de la positividad, representado tanto por la prevalencia de las reacciones positivas como por la intensidad global de las reacciones determinada mediante la media aritmética, (figura n° 13). Dicho incremento se manifiesta entre las personas de ambos sexos. Por otro lado, no se observó una positividad ligada al sexo en ninguno de los grupos de edad establecidos (figura n° 14)

Figura n° 13 - Relación entre la edad de la población y la positividad de la IDR en su aspecto cuantitativo (prevalencia) y cualitativo (media aritmética del diámetro de la pápula)

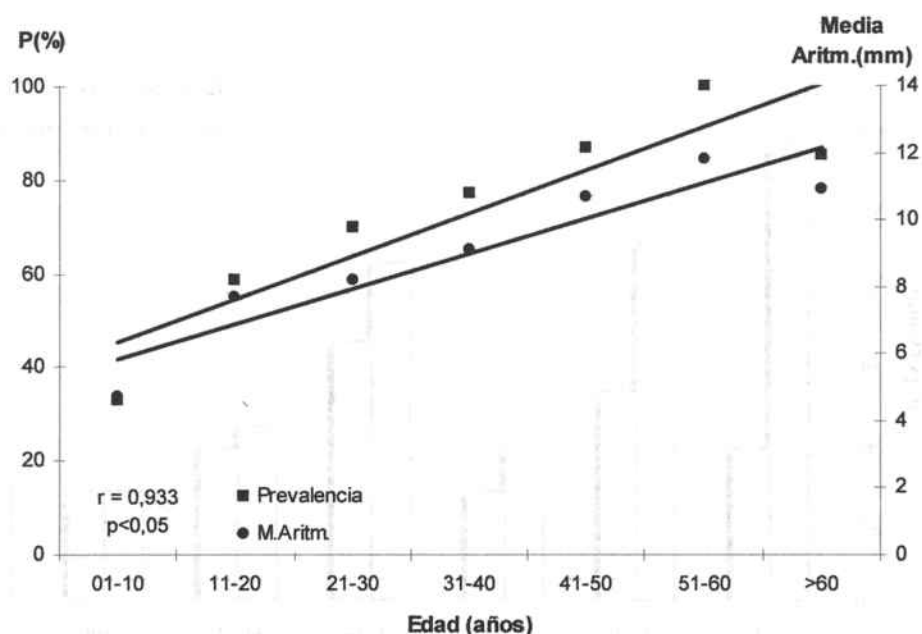
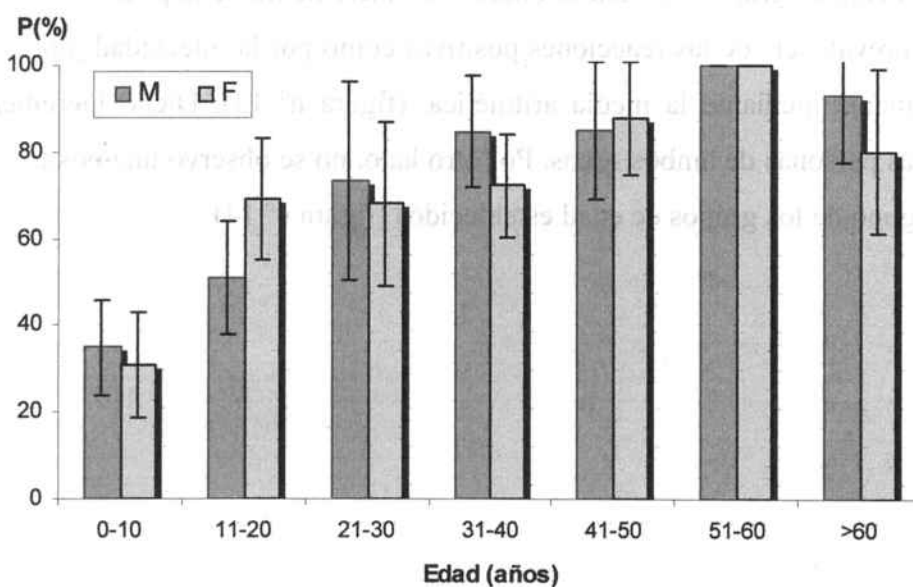


Figura n° 14 - Positividad según el sexo en cada grupo de edad



$\chi^2=0,21$	$\chi^2=3,1$	$\chi^2=0,1$	$\chi^2=1,84$	$\chi^2=0,88$	-	$\chi^2=0,3$
$p>0,05$	$p>0,05$	$p>0,05$	$p>0,05$	$p>0,05$	-	$p>0,05$

V.2.1.4. Desplazamientos a zonas endémicas

Al tomar los datos de las personas se notó que un gran número de ellas (10,8%) había viajado por otras regiones de Brasil o de Paraguay y Argentina, consideradas tradicionalmente endémicas de leishmaniosis. Los resultados indican que la positividad es mayor entre las personas que viajaron para dichas zonas endémicas que las que no salieron de su región (tabla n° 8).

Tabla n° 8 – Resultados de la IDR según desplazamiento a zonas endémicas

	N°	P (%)	
Personas que viajaron para zonas endémicas	48	81,2	
Personas que no viajaron	396	61,8	$\chi^2=6,98; p<0,05$

N° - número de personas analizadas

P(%) - prevalencia

V.2.1.5. Distribución de la positividad por localidad

En todas las localidades se detectaron personas positivas frente al antígeno de Montenegro. La distribución de los resultados presenta una diferencia estadística significativa entre el conjunto de las localidades ($\chi^2=35,65; 12 \text{ g.l. } p<0,05$). La mayor positividad se obtuvo en Venturin (76,9%) y la menor en Santa Ines (37,9%), tanto por el número de personas positivas (figura n° 15) como por la intensidad de las reacciones (figura n° 16). Sin embargo, las notables diferencias entre el número de personas analizadas en las localidades, dificulta el análisis comparativo global.

Figura n° 15 - Positividad frente al antígeno de Montenegro (prevalencia) obtenida en cada localidad

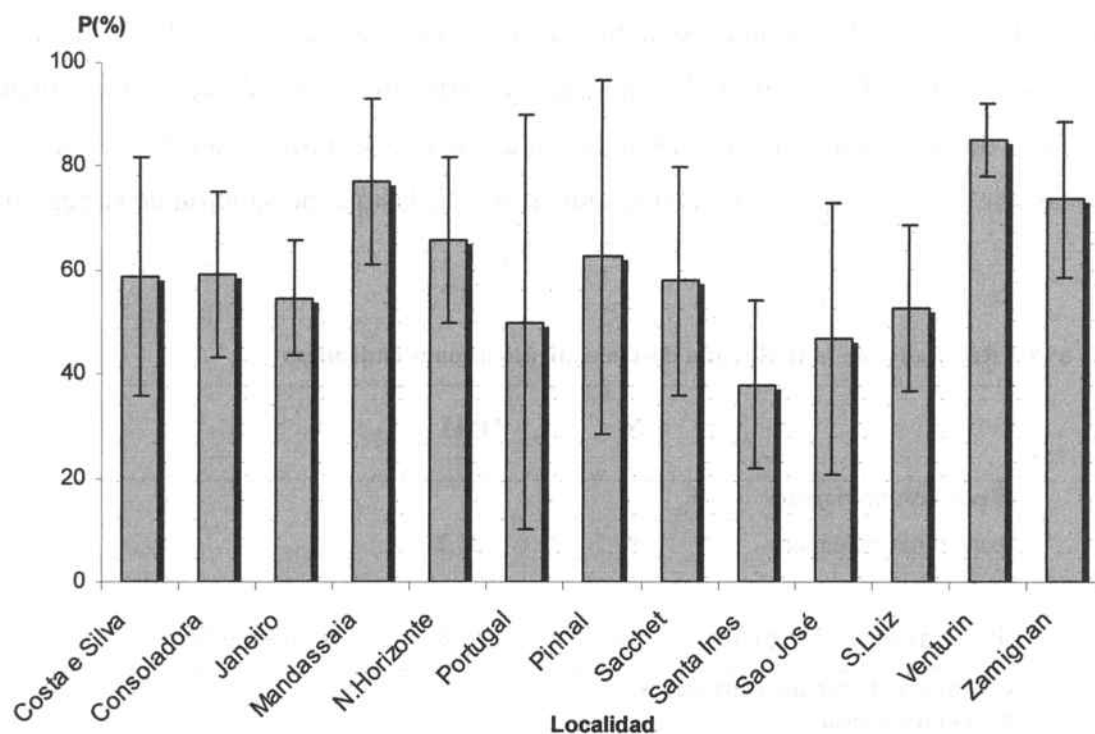
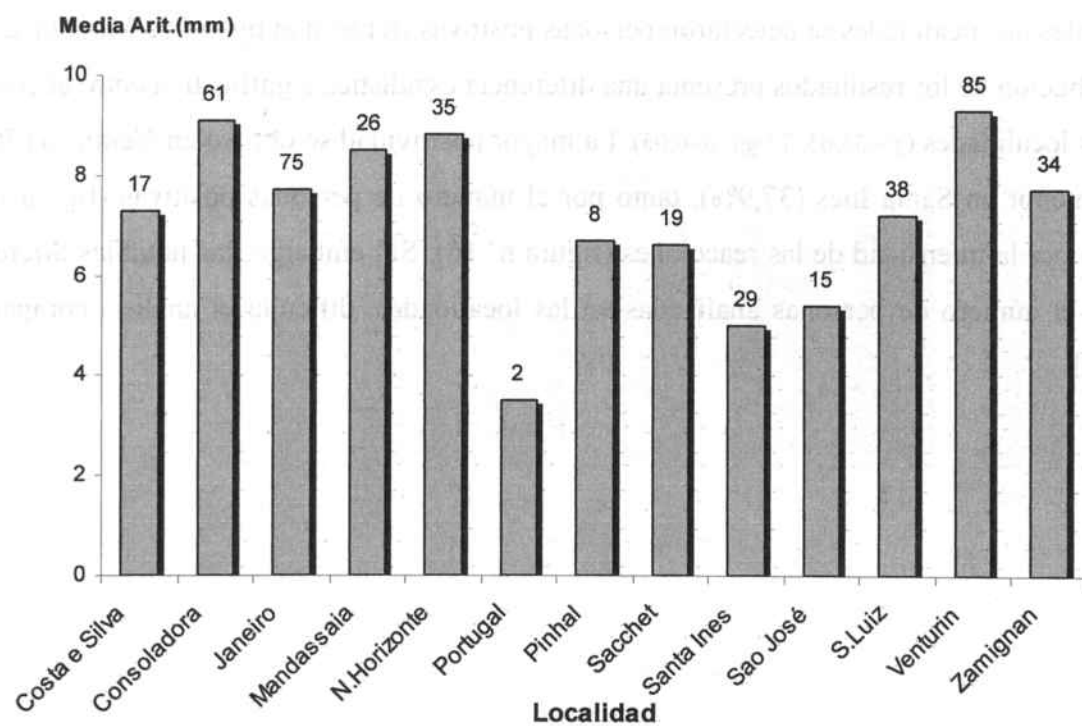


Figura n° 16 – Intensidad de la IDR (media aritmética del diámetro de la pápula) obtenida en cada localidad



Obs.: encima de cada barra de la figura se indica el número de personas analizadas

V.2.2. Resultados obtenidos con ELISA

Tal como se indica en el apartado de Material y Métodos, se recogieron muestras de sangre de 148 personas entre las que se realizó el test de hipersensibilidad retardada, para la realización de análisis serológico utilizando la técnica de ELISA. Las muestras fueron recogidas independientemente de la respuesta que la persona presentó en la intradermorreacción.

Considerando positivas las muestras que presentaron un valor igual o superior a las 66 U, conforme se determinó para los sueros del banco de Sangre de Chapecó; ninguna de las muestras analizadas alcanzó dicho valor, por lo que se consideró seronegativas la totalidad de las sangres analizadas. Sin embargo, algunas de las muestras presentaron valores cercanos al punto de corte. La presentación del conjunto de los resultados obtenidos a través de la técnica de ELISA se encuentra en el anexo nº 3.

A continuación se presentan los resultados cualitativos (media aritmética) de los títulos de anticuerpos específicos obtenidos frente al antígeno de *Leishmania*, utilizando la técnica de ELISA.

V.2.2.1. Sexo

Los resultados obtenidos en la serología del grupo de personas analizadas de los distintos sexos se indican en la tabla nº 9.

Tabla nº 9 – Media aritmética de los títulos de anticuerpos específicos obtenidos frente al antígeno de *Leishmania*

	Nº	M. Arit.-ELISA (U)
Masculino	67	16,4
Femenino	81	20

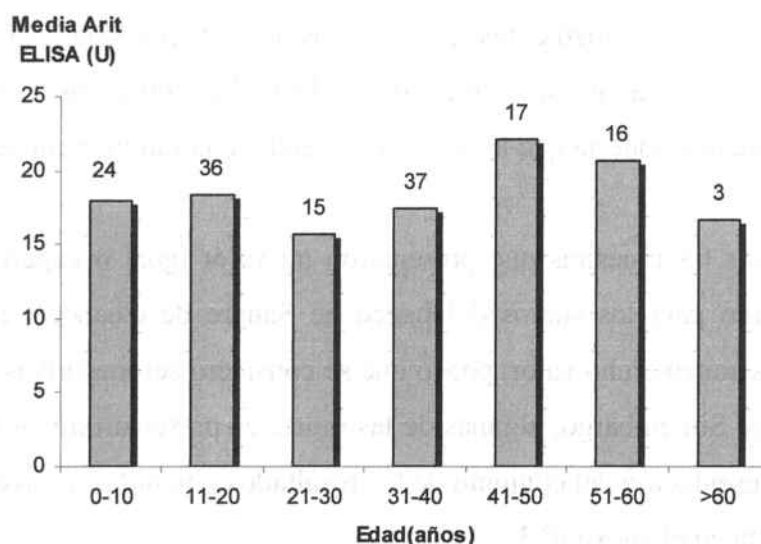
Nº - número de personas analizadas

M. Arit.-ELISA (U) – media aritmética (unidades obtenidas en ELISA)

V.2.2.2. Edad

Se distribuyeron las personas analizadas en siete grupos de edad cuyos resultados serológicos obtenidos, se representan en la figura nº 17.

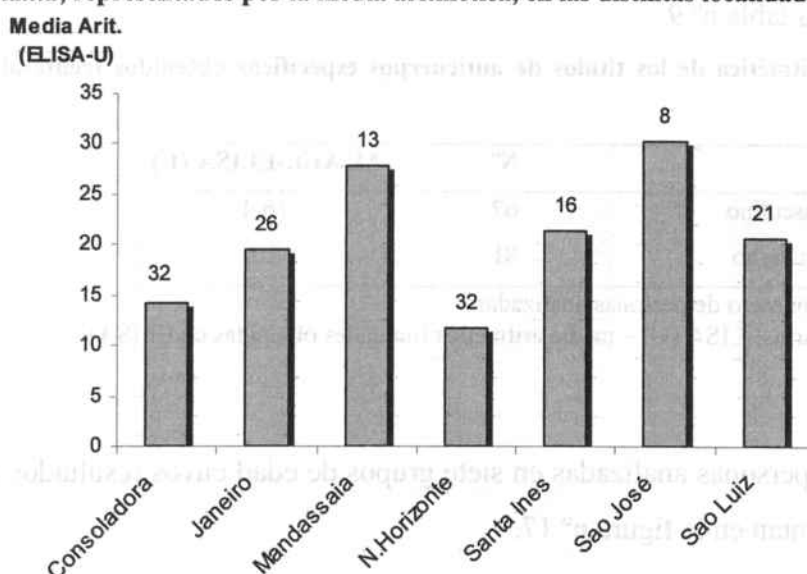
Figura n° 17 - Resultados de los títulos de anticuerpos específicos obtenidos frente al antígeno de *Leishmania*, representados por la media aritmética, en los distintos grupos de edad



Obs.: encima de cada barra de la figura se indica el número de personas analizadas
M.Arit.-ELISA (U) – media aritmética (Unidades obtenidas en ELISA)

V.2.2.3. Localidad – Se realizaron análisis serológicos de muestras de sangre de personas pertenecientes a siete localidades. Las mismas coinciden con las que se realizó el test de IDR. Los resultados obtenidos se presentan en la figura n° 18.

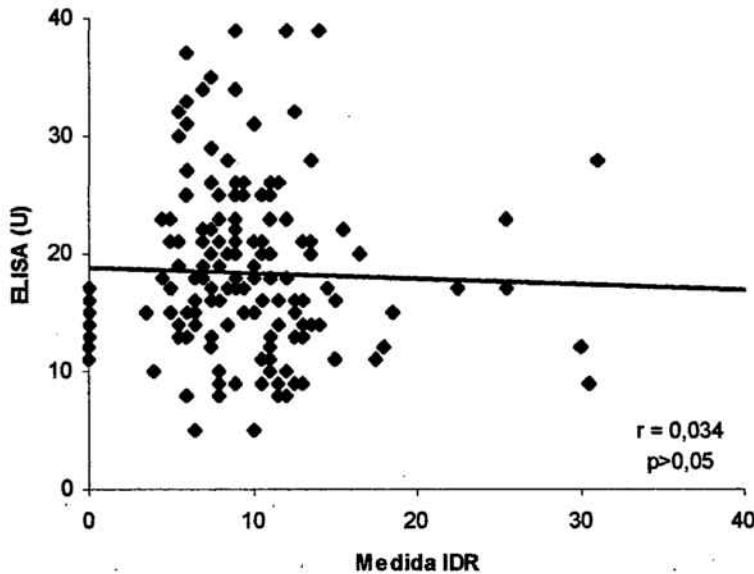
Figura n° 18 - Resultados de los títulos de anticuerpos específicos obtenidos frente al antígeno de *Leishmania*, representados por la media aritmética, en las distintas localidades



Obs.: Encima de cada barra de la figura se indica el número de personas analizadas
M.Arit.-ELISA (U) – Medida aritmética (Unidades obtenidas en ELISA)

Al analizar los resultados obtenidos entre las medidas de intradermorreacción y las unidades de ELISA, no se detecta una relación entre la serología y la respuesta de la hipersensibilidad retardada (figura n° 19).

Figura n° 19 – Relación entre la medida de la IDR y las Unidades obtenidas en ELISA



V.2.3. El *Western Blot* - La técnica de *Western Blot* se aplicó con el objetivo de discernir las fracciones específicas del antígeno de *Leishmania* reveladas por los distintos sueros y determinar su especificidad. Al practicar esta técnica con sangre eluida a partir del papel Whatman, se observó que todos los sueros revelaban algunas fracciones antigénicas, lo que confería a la técnica un notable “ruido de fondo” y dificultaba la interpretación de los resultados. Frente a eso, y de acuerdo con estudios anteriores, se hizo algunos ensayos para lograr la mejoría de los resultados.

Se realizó un tratamiento del antígeno, directamente en la membrana, con periodato de sodio y una reducción con borohidrato de sodio, que provoca una oxidación de los grupos hidroxil no substituidos de componentes glucídicos y con esto, posibilita la disminución de reacciones cruzadas asociadas a epítomos glucídicos (Cardeñosa y col., 1995). De la misma forma y para bloquear posibles lectinas presentes en el antígeno de *Leishmania*, se trataron las membranas con α -methyl-D-mannoside (Sigma 6882) a 200 mM (Duhamel, 1990 y Agudelo y Portús,

2000). Por otra parte, se incrementó la fuerza iónica del tampón Tris-Salino-Tween de 0,01M a 0,3M (anexo nº 1), para evitar la unión de proteínas de baja afinidad y se incrementó el tiempo de los lavados de la membrana, de 5 a 30 minutos cada uno, para lograr eliminar el “ruido de fondo” de la membrana revelada.

En los ensayos que se realizaron, se observó que con el aumento del tiempo de los lavados de la membrana y el incremento de la fuerza iónica del tampón, prácticamente desapareció la coloración de fondo que aparecía en las membranas. Sin embargo, continuaba revelándose un notable número de fracciones antigénicas. El tratamiento con periodato de sodio y α -methyl-D-mannoside no consiguió anular las uniones observadas.

La dificultad planteada para discernir las uniones que considerábamos inespecíficas de aquellas otras que podríamos considerar como específicas nos hizo optar por la técnica de ELISA para el estudio de la población humana. En este caso, la inespecificidad del *Western Blot* debe ser posiblemente consecuencia del uso de sangre total en lugar de la fracción sérica habitualmente utilizada.

V.3. EL RESERVORIO

V.3.1. Estudio con la población canina

Se llevó a cabo un muestreo con la población canina del municipio de Quilombo, totalizando 337 perros. En su mayoría, los animales pertenecen a zona rural viviendo fuera de las casas y durante el día están en el campo. Algunos animales se desplazan con frecuencia a otras comunidades tanto para la caza como para la compañía de sus dueños.

Una gran parte de ellos tenía aspecto sano pero un grupo de 24 animales (7%) presentaba por lo menos algún signo clínico compatible con una leishmaniosis, como lesiones cutáneas, adelgazamiento, onicogriposis y pérdida del pelo.

Figura n° 20 - Signos clínicos de leishmaniosis. Lesiones cutáneas y onicogriposis en un perro con serología positiva del municipio de Quilombo.



V.3.1.1. Diagnóstico parasitológico

El diagnóstico parasitológico se realizó en los perros con serología positiva o en los que se podía sospechar de la presencia de la enfermedad, por la existencia de signos clínicos compatibles.

Se estudiaron 35 animales a los que se hizo aspirado de piel, lesiones y/o punción de ganglio poplíteo. Para la obtención del material se respetaron las condiciones de máxima asepsia conforme Lanotte y col. (1977). Los cultivos se realizaron en medios de Schneider y NNN y fueron analizados al microscopio, dos veces a la semana durante cuatro meses en el caso del

medio de Schneider y una vez cada quince días para el NNN. Ninguno de ellos resultó positivo. Los perros a los que se realizó análisis parasitológico, con sus resultados individualizados están en el anexo n° 4.

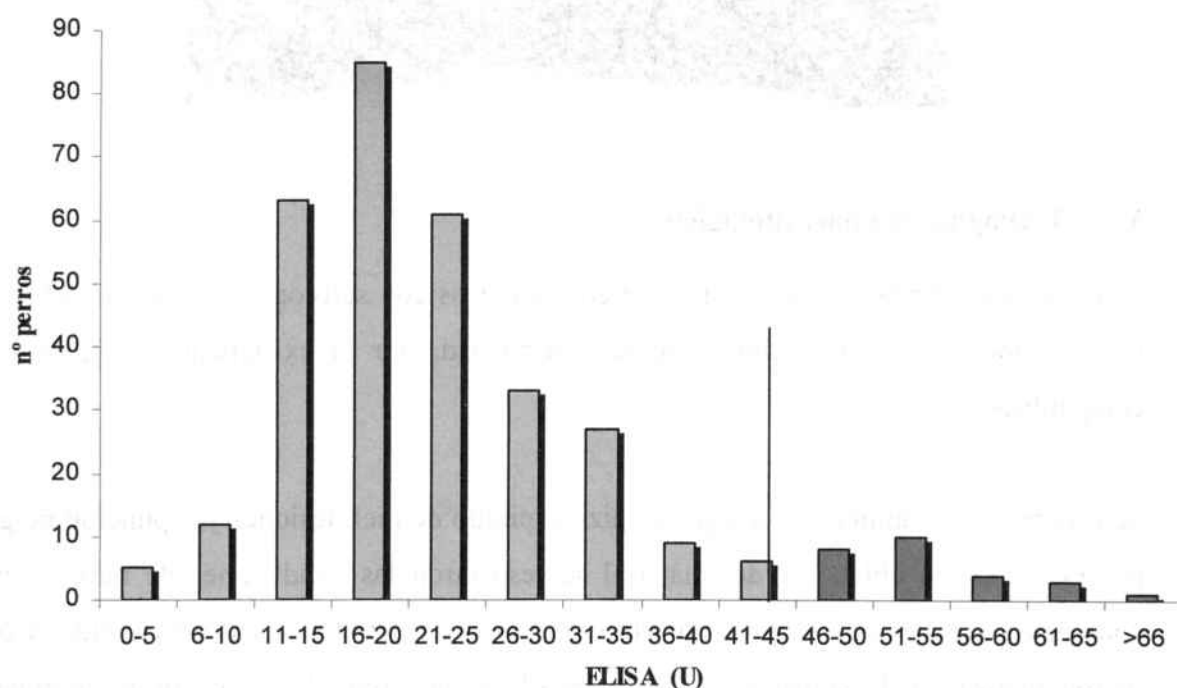
V.3.1.2. Diagnóstico serológico

a) El ELISA - De la misma forma como se indicó al referir los resultados serológicos mediante ELISA en la población humana, al estudiar la población canina fue necesario determinar el umbral de positividad de la técnica empleada para la población estudiada. En este caso, el cálculo de la media más tres veces la desviación estándar estableció el punto de corte en 43 U, valor que coincide también con el punto de inflexión de la curva bimodal observada en la distribución de los títulos de anticuerpos específicos de los perros analizados, punto este que se considera representativo de la separación entre las poblaciones indemne e infectada.

De acuerdo con esto, en los resultados obtenidos, se verificó que el 8,3% de los animales eran seropositivos frente al antígeno de *Leishmania* (figura n° 21).

La presentación del conjunto de resultados obtenidos de los perros analizados mediante la técnica de ELISA está en el anexo n° 4.

Figura n° 21 - Resultados obtenidos en el conjunto de perros analizados a través de ELISA. Se establece las 45 U como punto de corte.



b) El *Western Blot* – Así como se indica en el apartado V.2.3, del estudio con la población humana, la inespecificidad obtenida en los resultados realizados con sangre total, conservada en papel de filtro, impidió valorar los mismos con la técnica *Western Blot*.

V.3.1.3. Detección de anticuerpos anti-*Leishmania* en función de las características de la población canina estudiada

a) **Patología** - Entre los 337 perros estudiados, un grupo de 24 presentó sintomatología compatible con la leishmaniosis. De los animales que presentaban algún signo clínico, seis resultaron seropositivos (tabla nº 10). Cuatro, también con sintomatología, fueron seronegativos pero con valores cercanos al punto de corte y otros catorce perros dieron serología negativa. Analizando a partir del total de animales estudiados, se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los animales que presentaron síntomas y aquellos que no.

Tabla nº 10 – Seroprevalencia según la presencia de signos clínicos indicativos de leishmaniosis

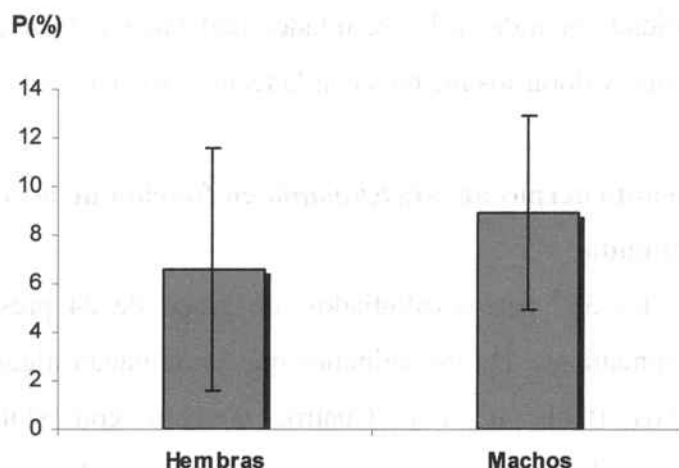
	Positivos	Negativos	P(%)
Perros con síntomas	6	18	25
Perros sin síntomas	22	291	7,0

($\chi^2=7,24$; $p < 0,05$).

P(%) - seroprevalencia

b) **Sexo** - Los animales analizados se han distribuido en 90 hembras y 247 machos. De éstos, 28 presentaron seropositividad y están repartidos en 22 machos y 6 hembras. En el grupo de los machos se detectó una seropositividad de un 8,9% y en las hembras el índice llegó al 6,6%, conforme se indica en la figura nº 22. Estadísticamente, los dos grupos no presentan diferencia de positividad ($\chi^2= 0,43$; $p > 0,05$).

Figura n° 22 - Seroprevalencia según el sexo en la población canina



c) Edad - La distribución de los animales que fueron seropositivos mediante ELISA en los distintos grupos de edad se representa en la figura n° 23. No se observa diferencia estadística significativa entre la seropositividad de los grupos establecidos ($\chi^2=4,90$; g.l=7; $p>0,05$) y tampoco la existencia de correlación entre la tasa de anticuerpos y la edad del animal (figura n° 24)

Figura n° 23 - Seroprevalencia según los grupos en edad de la población canina

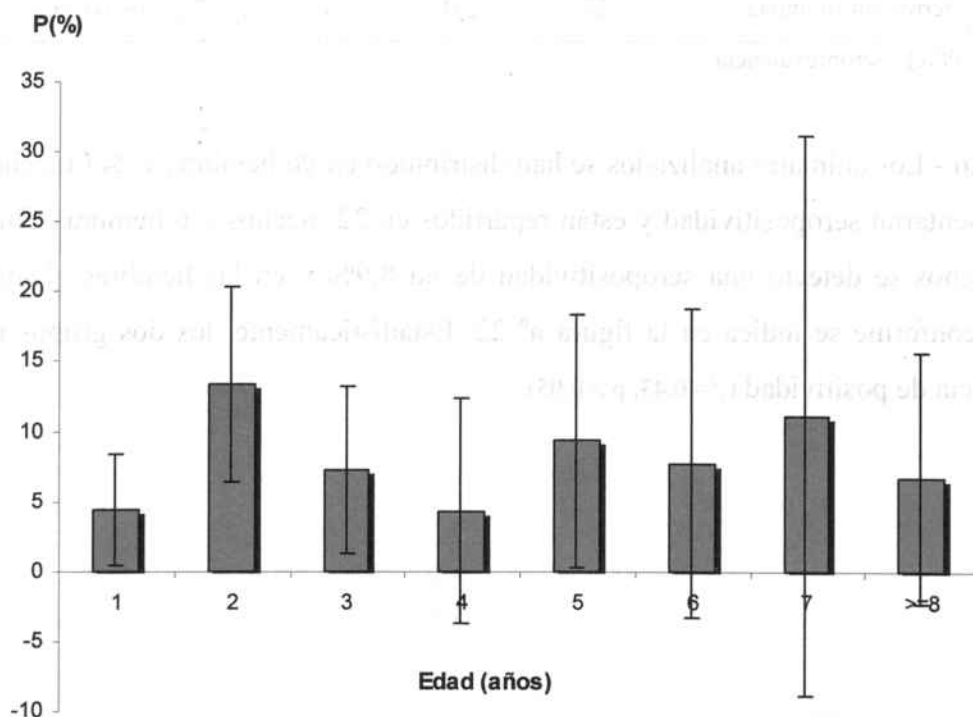
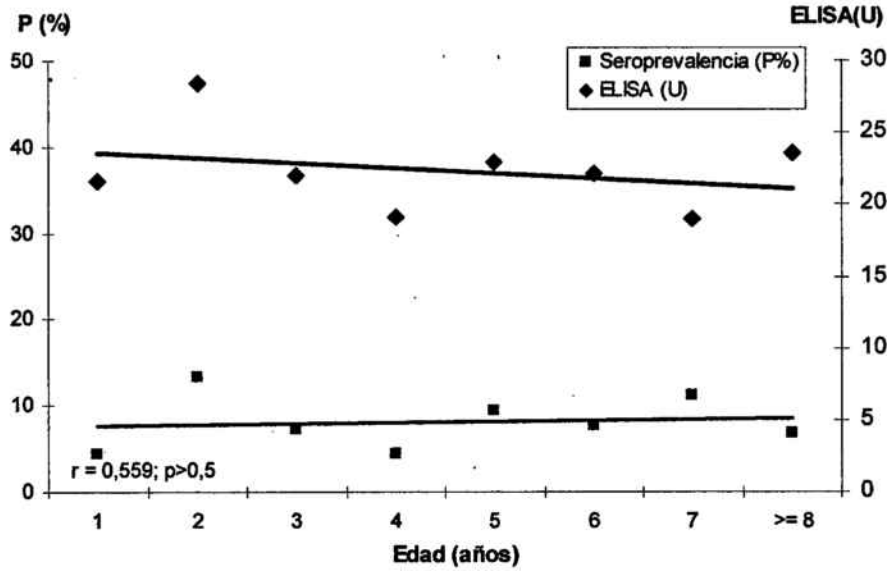


Figura n° 24 - Relación entre la edad de los animales y la positividad en su aspecto cuantitativo (prevalencia) y cualitativo (media aritmética de los títulos de anticuerpos específicos, Unidades obtenidas en ELISA).



Para analizar conjuntamente los factores de edad y sexo, se reunieron los animales en dos grupos: menores y mayores de cinco años (tabla n° 11). No se observó diferencia estadística significativa de la positividad entre los dos grupos en ninguno de los sexos. Aún cuando la aplicación estricta de los criterios estadísticos no permite aceptar la existencia de diferencias entre los grupos establecidos, los valores obtenidos entre las hembras aportan una probabilidad ($p=0,18$) bastante baja como para considerar que la diferencia observada sea debida al azar, máxime al tener en cuenta el diferente tamaño de las cohortes estudiadas.

Tabla n° 11 - Seroprevalencia según el sexo y los grupos de edad

	<u>1 a 5 años</u>		<u>> 5 años</u>		
	N°	P(%)	N°	P(%)	
Machos	173	8,6	82	9,7	$\chi^2=0,08; p>0,05$
Hembras	68	13,2	26	3,8	$\chi^2=1,74; p>0,05$

N° - número de animales examinados

P(%) - seroprevalencia

d) Tamaño y peso

Se analizó la influencia del tamaño y peso de la población canina, los cuales se distribuyeron en dos grupos: pequeños y grandes según el peso aproximado, cuando fuera inferior o superior a 20 kg. Se observa una mayor positividad entre los animales grandes presentando

una diferencia estadística significativa entre éstos y los de tamaño pequeño. Los resultados se indican en la tabla n° 12 y la figura n° 25.

Tabla n° 12 - Seroprevalencia según el peso y el tamaño de la población canina

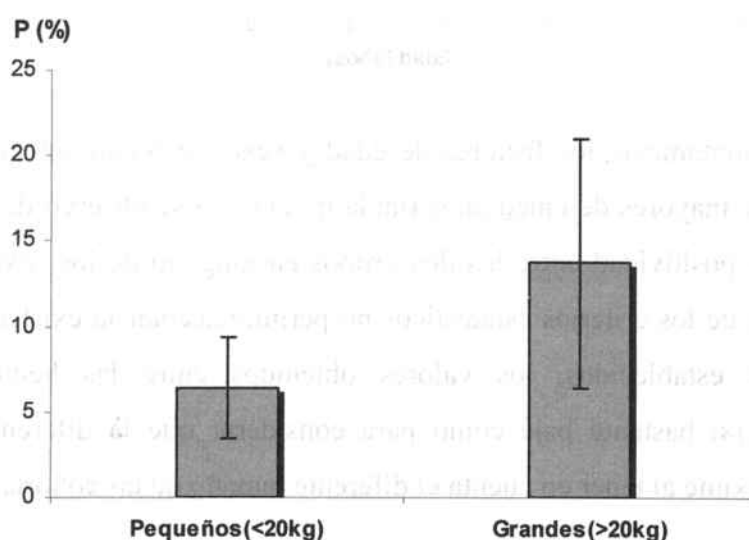
Tamaño	N°	P(%)
Pequeños	250	6,4
Grandes	87	13,8

$\chi^2=4,6; p<0,05$

N° - número de animales examinados

P(%) - seroprevalencia

Figura n° 25 - Seroprevalencia según el tamaño y peso del animal



e) Longitud del pelo - Se distribuyó la población canina según la longitud de su pelaje, donde se establecieron dos categorías: perros con pelo corto y con pelo mediano o largo. La seroprevalencia encontrada se indica en la tabla n° 13 y figura n° 26.

Tabla n° 13 - Seroprevalencia según la longitud del pelo en la población canina

Pelo	N°	P(%)
Corto	260	9,6
Mediano o largo	77	3,9

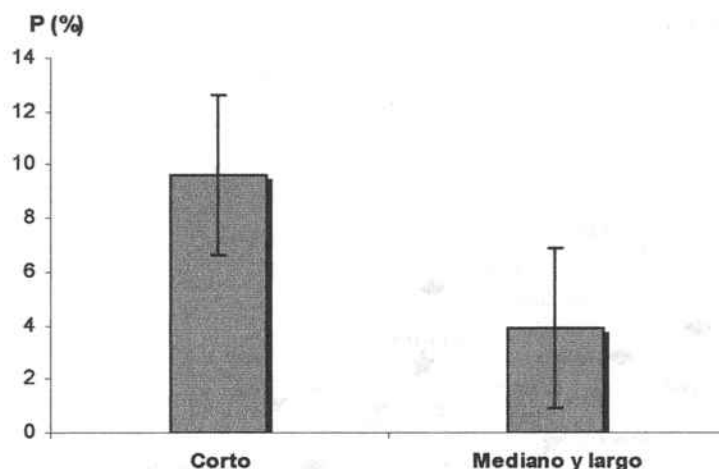
$\chi^2=2,55; p>0,05$

N° - número de animales estudiados

P(%) - seroprevalencia

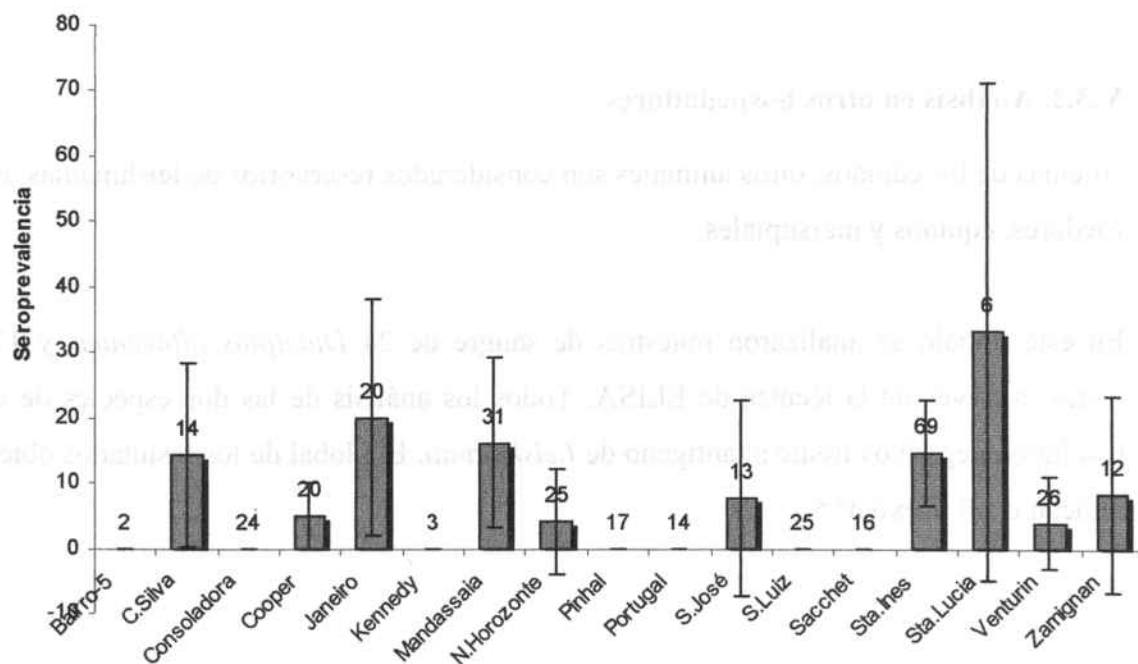
A pesar de que el número de animales que podemos considerar seropositivos al antígeno de *Leishmania*, parece ser inferior entre el grupo de perros con pelaje mediano o largo que entre los de pelo corto, tampoco en este caso, la notable diferencia entre el tamaño de los cohortes ha permitido adjudicar significado estadístico a esta observación ($p=0,11$).

Figura n° 26 - Seroprevalencia según el tipo de pelaje del animal



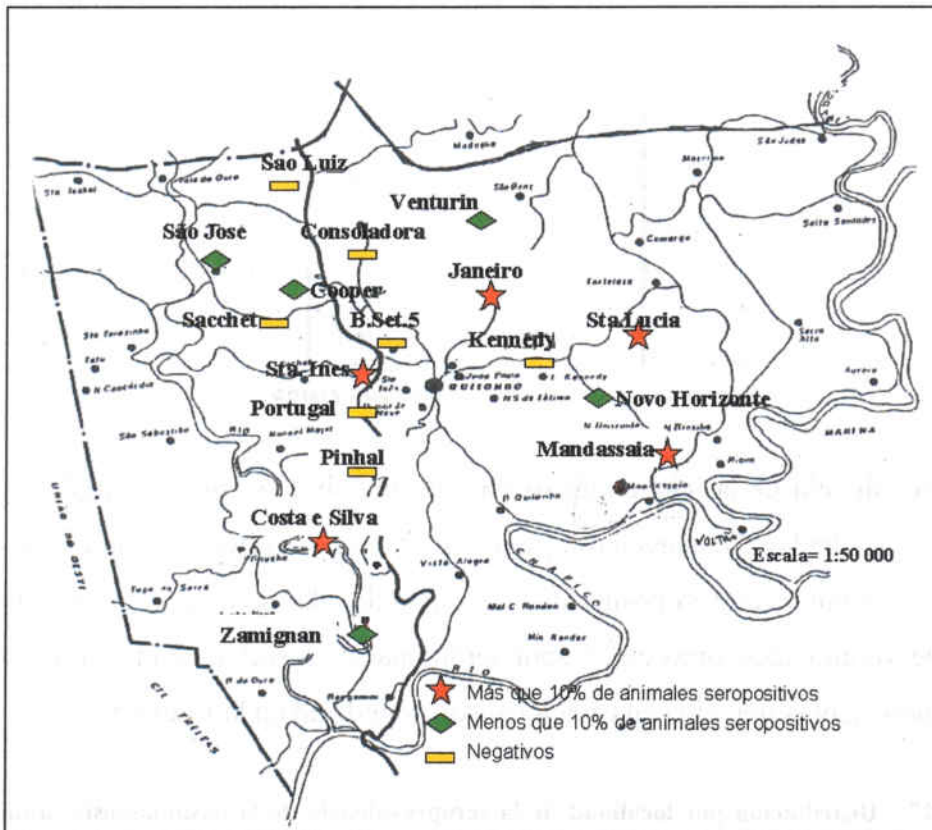
f) Seroprevalencia de la leishmaniosis canina distribuida por localidad - En 7 de las 17 localidades estudiadas no aparecieron perros seropositivos, mientras que en las otras diez, se detectó algún animal con seropositividad: en cinco de ellas se detectó seropositividad en más del 10% de los animales, otras cinco obtuvieron una seropositividad menor al 10%. Los datos de la seroprevalencia obtenida en cada localidad se indican en la figura n° 27.

Figura n° 27 - Distribución por localidad de la seroprevalencia de la leishmaniosis canina. En cima de cada barra se indica el número de perros estudiados en cada localidad



El bajo número de animales analizados en algunas de las localidades estudiadas impide efectuar distribuciones estadísticas. De todas formas, en la figura n° 28 se presenta la distribución de la seropositividad dentro del municipio.

Figura n° 28 - Mapa del municipio de Quilombo indicando las localidades y los respectivos resultados de la seropositividad de los perros



V.3.2. Análisis en otros hospedadores

Además de los cánidos, otros animales son considerados reservorios de leishmanias, como los roedores, equinos y marsupiales.

En este trabajo se analizaron muestras de sangre de 24 *Didelphis albiventris* y 17 *Rattus rattus*, a través de la técnica de ELISA. Todos los análisis de las dos especies de animales resultaron negativos frente al antígeno de *Leishmania*. El global de los resultados obtenidos se indican en el anexo n° 5.

Figura n° 29 - *Didelphis albiventris* capturado en Chapecó (Foto: Vanessa Fortes – UNOESC)



V.4. EL VECTOR

Los estudios sobre el vector se realizaron con el propósito de conocer las especies presentes en la zona, su densidad, abundancia, frecuencia y estacionalidad.

Según Vattier-Bernard y Trouillet (1983), la riqueza específica de una población de flebotominos es el número de especies que la componen. Está sujeta a variaciones dependiendo del lugar y la época del año en que se ha efectuado la captura.

Según los autores antes mencionados, la frecuencia (F) es la relación entre el número de estaciones donde se encontró una especie determinada y el número total de estaciones estudiadas. La abundancia (A), está dada por el número relativo de ejemplares de una determinada especie de flebotominos respecto al número total de ejemplares capturados. Estos autores establecen la siguiente clasificación en función de la frecuencia observada:

Especies muy comunes: con una frecuencia superior al 50%

Especies comunes: con una frecuencia entre el 25,1 y el 50%

Especies raras: con una frecuencia entre el 10 y el 25%

Especies muy raras: con una frecuencia inferior al 10%.

V.4.1. Resultados globales

Como se mencionó en el apartado de Material y Métodos, se utilizaron tres tipos de trampas para realizar este estudio: las de papel adhesivo, Shannon y CDC. En las 16 localidades en que se llevó a cabo este estudio, se colocaron 2622 trampas de papel adhesivo, lo que representa una superficie de 209,76 m² (papel con 20 cm de lado, considerándose las dos caras). Con la trampa Shannon fueron 11 noches de captura y con las CDC 76 noches con un total de 329 trampas.

V.4.1.1. Estudio cualitativo: riqueza específica

En este estudio se identificaron nueve especies de *Lutzomyia* y una de *Brumptomyia*, tal como se indica a continuación:

- Género *Lutzomyia* França, 1924
 Subgénero *Nyssomyia* Barreto 1962
 Especie *Lutzomyia neivai* (Pinto, 1926)
 Subgénero *Pintomyia* Costa Lima 1932
 Especie *Lutzomyia fischeri* (Pinto, 1926)
 Subgénero *Psathyromyia* Barreto 1962
 Especie *Lutzomyia shannoni* (Dyar, 1929)
 Grupo *Migonei* Theodor 1965
 Especie *Lutzomyia migonei* (França, 1920)
Lutzomyia firmatoi (Barreto, Martins & Pellegrino, 1956)
 Grupo *Lanei* Theodor 1965
 Especie *Lutzomyia lanei* (Barreto & Coutinho, 1941)
 Grupo *Oswaldoi* Theodor 1965
 Especie *Lutzomyia alphabetica* (Fonseca, 1936)
Lutzomyia borgmeieri Martins, Falcão & Silva, 1972
 Grupo *Rupicola* Lewis et al 1977
 Especie *Lutzomyia correalimai* Martins, Coutinho & Luz, 1970
 Género *Brumptomyia* França & Parrot, 1920
 Especie *Brumptomyia nitzulescui* (Costa Lima, 1932)

V.4.1.2. Estudio cuantitativo

En total fueron capturados 3412 ejemplares, siendo 2227 machos y 1185 hembras (tabla nº 14). La proporción de machos es superior a la de las hembras con 65,3% frente a un 34,7%.

Tabla nº 14 - Totalidad de flebotominos capturados y su distribución por especie y sexo

Especie	machos		hembras		Total
	Nº	%	Nº	%	
<i>Lu. neivai</i>	1056	70,7	438	29,3	1494
<i>Lu. migonei</i>	868	65,1	466	34,9	1334
<i>Lu. lanei</i>	217	83,8	42	16,2	259
<i>Lu. fischeri</i>	35	20	140	80	175
<i>Lu. firmatoi</i>	11	57,9	8	42	19
<i>Lu. correalimai</i>	1	50	1	50	2
<i>Lu. alphabetica</i>	15	20,5	58	79,5	73
<i>Lu. shannoni</i>	-	-	7	100	7
<i>Lu. borgmeieri</i>	-	-	4	100	4
<i>B. nitzulescui</i>	24	53,3	21	46,7	45
Total	2227	65,3	1185	34,7	3412

En relación al estudio cuantitativo, se observa que la especie más abundante es *Lu. neivai* seguida de *Lu. migonei* (tabla nº 15). A continuación, y con una abundancia mucho menor, se

encuentran *Lu. lanei* y *Lu. fischeri*. Las demás especies no han superado el 3% de la colección.

Por otro lado, con relación a la frecuencia de las especies capturadas en esta zona de estudio, se registra la presencia de cuatro especies muy comunes (*Lu. neivai*, *Lu. migonei*, *Lu. lanei* y *Lu. fischeri*), tres especies comunes (*Lu. firmatoi*, *Lu. alphabetica* y *B. nitzulescui*), dos especies raras (*Lu. shannoni* y *Lu. borgmeieri*) y una especie muy rara (*Lu. correalimai*) (tabla n.º 15).

Tabla n.º 15 – Número, abundancia (%) y frecuencia (%) de los flebotominos capturados en el municipio de Quilombo

Especie	Nº	Abundancia (%)	Frecuencia (%)
<i>Lu. neivai</i>	1494	43,8	93,7
<i>Lu. migonei</i>	1334	39,1	100
<i>Lu. lanei</i>	259	7,6	81,2
<i>Lu. fischeri</i>	175	5,1	68,7
<i>Lu. firmatoi</i>	19	0,6	0,31
<i>Lu. correalimai</i>	2	0,06	0,06
<i>Lu. alphabetica</i>	73	2,2	0,43
<i>Lu. shannoni</i>	7	0,2	0,18
<i>Lu. borgmeieri</i>	4	0,1	0,12
<i>B. nitzulescui</i>	45	1,3	0,5
Total	3412		

V.4.1.3. Resultados obtenidos con cada tipo de trampa

a) Papel adhesivo - Las trampas de papel adhesivo representaron una superficie de 209,76 m² siendo positiva para la captura de flebotominos una superficie de 25,92 m², lo que representa el 12% del área estudiada. En la tabla n.º 16 se presenta el número, densidad, abundancia y frecuencia obtenidas, así como el porcentaje de machos encontrados en las capturas realizadas con este tipo de trampa.

Tabla n° 16 – Abundancia (%), frecuencia (%), densidad y porcentaje de machos capturados con trampas de papel adhesivo en el municipio de Quilombo

Especie	N°	Abundancia (%)	Frecuencia (%)	Densidad (m ²) D	Machos (%)
<i>Lu. neivai</i>	10	22	20	0,04	70
<i>Lu. migonei</i>	26	59	33	0,12	84
<i>Lu. lanei</i>	3	6	13	0,01	66
<i>Lu. fischeri</i>	5	11	6	0,02	40
Total	44			0,21	75

D = Densidad calculada sobre el área total (209,76 m²)

La especie más abundante fue *Lu. migonei*, que ha sido también la que presentó una frecuencia mayor. De las especies capturadas con este tipo de trampa, *Lu. migonei* se comportó como especie común, *Lu. neivai* y *Lu. lanei*, como especies raras y *Lu. fischeri* como muy rara al no superar el 10% de frecuencia. A excepción de *Lu. fischeri*, el porcentaje de machos ha sido superior al de las hembras.

b) CDC - Las trampas CDC colocadas fueron 329, siendo positivas para la captura un 53,8% de ellas. La gran mayoría de los ejemplares fueron capturados con este tipo de trampa tal como se puede observar en la tabla n° 17.

Tabla n° 17 - Abundancia (%), frecuencia (%) y el número de ejemplares por trampa (CDC) de flebotominos capturados en el municipio de Quilombo

Especie	N°	Abundancia (%)	Frecuencia (%)	Machos (%)	N° flebot./trampa
<i>Lu. neivai</i>	1484	44,1	93,3	70,6	4,5
<i>Lu. migonei</i>	1308	38,8	100	64,6	4,0
<i>Lu. lanei</i>	256	7,6	86,6	83,9	0,8
<i>Lu. fischeri</i>	170	5,1	73,3	19,4	0,5
<i>Lu. firmatoi</i>	19	0,6	33,3	57,8	< 0,1
<i>Lu. correalimai</i>	2	0,05	6,7	50	< 0,1
<i>Lu. alphabetica</i>	73	2,2	53,3	20,5	0,2
<i>Lu. shannoni</i>	7	0,2	20	-	< 0,1
<i>Lu. borgmeieri</i>	4	0,1	13,3	-	< 0,1
<i>B. nitzulescui</i>	45	1,3	53,3	53,3	0,1
Total	3368			65,4	10,2

c) Shannon - Con la Shannon no se capturó ningún ejemplar en los locales y horarios en que se armó la trampa.

V.4.1.4. Resultados globales obtenidos en cada localidad

En las tablas n° 18 y 19, se indican las localidades en que hubo capturas de las distintas especies de flebotominos, tanto con las trampas de papel adhesivo como con las CDC. Se observa que las trampas CDC fueron mucho más eficaces, capturándose con éstas, las diez especies encontradas en la zona, mientras que con las de papel adhesivo se capturaron cuatro especies y solamente en seis localidades. Con los papeles adhesivos la localidad de Zamignan presentó una mayor riqueza específica, mientras que con las CDC la mayor riqueza se observó en Janeiro, donde se capturaron ejemplares de todas las especies identificadas en este estudio. En las tablas n° 20 y 21 están representadas la abundancia y el número de flebotominos por trampa (CDC) respectivamente, de las distintas especies de flebotominos obtenidos en cada localidad.

Tabla n° 20 – Abundancia de las especies de flebotominos encontrados en cada localidad (CDC)

Especie	Abundancia (%) - Localidad															
	C.Silva	Consolidadora	Cooper	Janeiro	Kennedy	Mandassaia	N.Horizonte	Pinhal	Portugal	S.Ines	S.José	S.Lucia	S.Luiz	Sacohet	Venturin	Zarnignan
<i>Ln. neivai</i>	11,1	41	68,3	46,3	12,5	15	-	30	58,8	57,1	48,8	6,3	48,2	67,9	37,5	18
<i>Ln. migonei</i>	26	38,4	23,5	41,3	68,8	55	75	50	30,9	28,6	48,8	65,1	51,8	25	45,8	42,5
<i>Ln. lanei</i>	37	12,8	1,3	8,6	4,7	25	12,5	10	1,5	-	-	11,1	-	7,1	8,3	10,3
<i>Ln. fischeri</i>	7,4	2,6	2,6	1,6	6,2	-	-	10	1,5	-	2,4	14,2	-	-	4,2	19,6
<i>Ln. firmatoi</i>	7,4	-	0,4	0,2	1,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,9
<i>Ln. correalinae</i>	-	-	-	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ln. alphabetica</i>	-	2,6	1,8	1,6	-	-	-	-	4,4	14,2	-	3,2	-	-	4,2	4
<i>Ln. shannoni</i>	-	-	0,2	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7
<i>Ln. borgmeieri</i>	-	-	-	0,1	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. nitzulescui</i>	11,1	11,1	2	0,2	6,2	-	12,5	-	2,9	-	-	-	-	-	-	3

Tabla n° 21 – Número de flebotominos/trampa encontrados en cada localidad (CDC)

Especie	N° Flebotominos/trampa - Localidad															
	C.Silva	Consolidadora	Cooper	Janeiro	Kennedy	Mandassaia	N.Horizonte	Pinhal	Portugal	S.Ines	S.José	S.Lucia	S.Luiz	Sacohet	Venturin	Zarnignan
<i>Ln. neivai</i>	0,2	0,8	14,6	11,9	0,7	0,2	-	0,25	4,5	0,2	1,9	0,3	2,8	1,2	0,6	2,0
<i>Ln. migonei</i>	0,5	0,7	5	10,5	3,7	0,6	0,5	0,4	2,3	0,1	1,9	3,4	3	0,4	0,7	4,7
<i>Ln. lanei</i>	0,7	0,2	0,3	2,2	0,2	0,3	0,09	0,08	0,1	-	-	0,6	-	0,1	0,1	1,2
<i>Ln. fischeri</i>	0,1	0,05	0,6	0,4	0,3	-	-	0,08	0,1	-	0,09	0,7	-	-	0,07	2,1
<i>Ln. firmatoi</i>	0,1	-	0,08	0,04	0,08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2
<i>Ln. correalinae</i>	-	-	-	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ln. alphabetica</i>	-	0,05	0,4	0,4	-	-	-	-	0,3	0,1	-	0,2	-	-	0,07	0,5
<i>Ln. shannoni</i>	-	-	0,04	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,08
<i>Ln. borgmeieri</i>	-	-	-	0,03	-	0,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. nitzulescui</i>	0,2	0,05	0,4	0,06	0,3	-	0,09	-	0,2	-	-	-	-	-	-	0,3
Total	1,8	1,8	21,4	25,6	5,3	1,1	0,7	0,8	7,5	0,4	3,9	5,2	5,8	1,7	1,6	11,1

La especie *Lu. neivai* fue la más abundante en 6 de las 16 localidades estudiadas y *Lu. migonei* en ocho de ellas. Las dos especies tuvieron abundancia igual en una localidad. Por otro lado, las localidades en que se capturó un mayor número de ejemplares por trampa fue en Janeiro, Cooper y Zamignan.

V.4.2. Estacionalidad

Tal como se mencionó en el apartado de Material y Métodos, las capturas se realizaron en dos etapas: la primera en enero y febrero/99 y la segunda de octubre/99 a febrero/00.

V.4.2.1. Capturas realizadas en la primera etapa (enero y febrero/99)

En esta etapa fueron estudiadas cinco localidades: Costa e Silva, Janeiro, Mandassaia, Pinhal y Zamignan. En este período las temperaturas oscilaron entre 24,6 a 32,5 de máxima y 14,8 a 22,6 de mínima. La humedad relativa del aire estuvo entre 72,7 a 78,2% y la pluviometría marcó los 247,2 mm en enero y 61,3 mm en febrero (Los datos meteorológicos fueron proporcionados por la Estação de Meteorologia da EPAGRI, Chapecó).

La captura con papel adhesivo fue insignificante en ese periodo, por lo que los resultados relativos a la densidad se presentan conjuntamente en la tabla n° 16 de los resultados globales. La captura fue positiva en tres de las cinco localidades, encontrándose cuatro especies de flebotominos (tabla n° 22) y, con las CDC, se capturaron ejemplares en tres localidades, encontrándose ocho especies (tabla n° 23). Fueron colocadas 30 trampas CDC en 10 noches. De éstas se obtuvo captura positiva en 11 (36,7%). En la tabla n° 24 se presentan los resultados obtenidos de las capturas realizadas con las trampas CDC y los resultados globales de las capturas realizadas en la primera etapa con los dos tipos de trampas.

Tabla n° 22 – Presencia de flebotominos en las distintas localidades capturadas con trampas de papel adhesivo

Especie	C. Silva	Janeiro	Mandassaia	Pinhal	Zamignan
<i>Lu. neivai</i>	X	X			X
<i>Lu. migonei</i>					X
<i>Lu. lanei</i>					X
<i>Lu. fischeri</i>					X

Tabla n° 23 – Presencia de flebotominos en las distintas localidades capturadas con trampas CDC

Especie	C. Silva	Janeiro	Mandassaia	Pinhal	Zamignan
<i>Lu. neivai</i>	X	X			X
<i>Lu. migonei</i>	X	X			X
<i>Lu. lanei</i>		X			X
<i>Lu. fischeri</i>		X			X
<i>Lu. firmatoi</i>		X			
<i>Lu. alphabetica</i>		X			
<i>Lu. borgmeieri</i>		X			
<i>B. nitzulescui</i>		X			

Tabla n° 24 - Resultados de las capturas realizadas en la primera etapa con trampas de papel adhesivo y CDC (enero y febrero/99)

Especie	PA	CDC	Abundancia (%)	Frecuencia (%)	Machos (%)	N° Flebot./trampa T
<i>Lu. neivai</i>	1	40	42,7	60	56,1	1,3
<i>Lu. migonei</i>	3	29	33,3	60	68,7	0,9
<i>Lu. lanei</i>	3	3	6,3	40	83,3	0,1
<i>Lu. fischeri</i>	-	13	13,5	40	-	0,4
<i>Lu. firmatoi</i>	-	1	< 0,11	20	-	< 0,1
<i>Lu. alphabetica</i>	-	1	< 0,1	20	-	< 0,1
<i>Lu. borgmeieri</i>	-	1	< 0,1	20	-	< 0,1
<i>B. nitzulescui</i>	-	1	< 0,1	20	100	< 0,1
Total	7	89			52,1	2,9

PA = N° de flebotominos capturados con trampas de papel adhesivo

CDC = N° de flebotominos capturados con trampas CDC

Las especies *Lu. neivai* y *Lu. migonei* fueron las más abundantes en este periodo. La primera de ellas ha sido más abundante en Janeiro, mientras que la segunda lo ha sido en Costa e Silva y Zamignan. Las localidades de Janeiro y Zamignan fue donde se capturó una mayor variedad de especies y en mayor número, por lo que se escogieron estas dos localidades para los estudios de fenología en la etapa siguiente.

En las tablas nº 25 y 26 se indican los resultados de las capturas representados por la abundancia y el número de flebotominos/trampa, por especie y localidad de estudio.

Tabla nº 25 - Abundancia de flebotominos capturados en el período de enero y febrero/99, en cada una de las localidades

Abundancia (%)					
Especie	C. Silva	Janeiro	Mandassaia	Pinhal	Zamignan
<i>Lu. neivai</i>	33,3	58,1	-	-	12,9
<i>Lu. migonei</i>	66,7	19,3	-	-	58,1
<i>Lu. lanei</i>	-	4,8	-	-	3,2
<i>Lu. fischeri</i>	-	11,3	-	-	19,3
<i>Lu. firmatoi</i>	-	1,6	-	-	-
<i>Lu. alphabetica</i>	-	1,6	-	-	-
<i>Lu. borgmeieri</i>	-	1,6	-	-	-
<i>B. nitzulescui</i>	-	1,6	-	-	-

Tabla nº 26 - Número de flebotominos/trampa capturados en el período de enero y febrero/99, en cada una de las localidades

Nº flebotominos/trampa (CDC=30)					
Especie	C.Silva	Janeiro	Mandassaia	Pinhal	Zamignan
<i>Lu. neivai</i>	>0,1	1,2	-	-	0,1
<i>Lu. migonei</i>	>0,1	0,3	-	-	0,6
<i>Lu. lanei</i>	-	>0,1	-	-	0,1
<i>Lu. fischeri</i>	-	0,2	-	-	0,2
<i>Lu. firmatoi</i>	-	>0,1	-	-	-
<i>Lu. alphabetica</i>	-	>0,1	-	-	-
<i>Lu. borgmeieri</i>	-	>0,1	-	-	-
<i>B. nitzulescui</i>	-	>0,1	-	-	-
Total	0,1	1,8			1

V.4.2.2. Capturas realizadas en la segunda etapa (octubre/99 a febrero/00)

En este periodo, que fue de octubre/99 a febrero/00, se realizaron las siguientes capturas:

- Tanto en el mes de noviembre/99 como en enero/00 se colocaron trampas CDC y de papel adhesivo en todas las localidades estudiadas (15 y 16 localidades, respectivamente). En cada uno de los periodos las trampas CDC fueron puestas, a lo largo de quince días, durante una noche en cada una de las poblaciones. Las de papel adhesivo se dejaron siete días hasta que fueron recolectadas.
- Desde octubre/99 hasta febrero/00 se efectuó un seguimiento fenológico, con trampas CDC y una periodicidad quincenal, en las localidades de Janeiro y Zamignan.

En la tabla n° 27 se presenta el resultado global de las capturas realizadas en la segunda etapa, con las trampas CDC y papel adhesivo. Las primeras, del mismo modo que en la etapa anterior, fueron más eficaces para la captura.

Tabla n° 27 - Resultados globales de las capturas efectuadas en la segunda etapa (octubre/99 a febrero/00)

Especie	PA	CDC	Abundancia (%)	Frecuencia (%)	Machos (%)	N° Flebot./trampa
<i>Lu. neivai</i>	10	1444	43,8	93,3	71,1	4,4
<i>Lu. migonei</i>	22	1281	39,3	100	65	3,9
<i>Lu. lanei</i>	2	251	7,6	81,2	83,8	0,8
<i>Lu. fischeri</i>	3	158	4,9	68,7	20	0,5
<i>Lu. firmatoi</i>		18	0,6	31,2	57,9	< 0,1
<i>Lu. correalimai</i>		2	0,06	6,2	50	< 0,1
<i>Lu. alphabetica</i>		72	2,2	50	20,5	0,2
<i>Lu. shannoni</i>		7	0,2	18,7	0	< 0,1
<i>Lu. borgmeieri</i>		4	0,1	12,5	0	< 0,1
<i>B. nitzulescui</i>		44	1,3	50	52,2	0,1
Total	37	3281			65,8	9,7

PA = N° de flebotominos capturados con trampas de papel adhesivo

CDC = N° de flebotominos capturados con trampas CDC

En las tablas n° 28 y 29 se presentan las localidades en que se capturaron las distintas especies con trampas de papel adhesivo y CDC. Con las primeras se capturaron cuatro especies en seis de las dieciséis localidades, mientras que con las otras se capturaron ejemplares en todas las localidades y se obtuvo la presencia de las diez especies identificadas en este estudio.

Tabla n° 28 – Presencia de flebotominos en las distintas localidades capturados con trampas de papel adhesivo (octubre/99 a febrero/00)

Especie	C.Silva														
	Consolidadora	Cooper	Janeiro	Kennedy	Mandassaia	NHorizonte	Pinhal	Portugal	S.lnes	S.José	SLuiz	SLucia	Sacchet	Venturin	Zamignan
<i>Lt. neival</i>				X			X				NR*				X
<i>Lt. migonei</i>	X	X		X											X
<i>Lt. lanei</i>		X													X
<i>Lt. fischeri</i>															X
<i>Lt. firmatoi</i>															
<i>Lt. correalmiai</i>															
<i>Lt. alphabeticata</i>															
<i>Lt. shannoni</i>															
<i>Lt. borgmeieri</i>															
<i>B. nitzalescui</i>															

*NR – No realizado

Tabla n° 29 – Presencia de flebotominos en las distintas localidades capturados con trampas CDC (octubre/99 a febrero/00)

Especie	C.Silva														
	Consolidadora	Cooper	Janeiro	Kennedy	Mandassaia	NHorizonte	Pinhal	Portugal	S.lnes	S.José	SLucia	SLuiz	Sacchet	Venturin	Zamignan
<i>Lt. neival</i>	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Lt. migonei</i>	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Lt. lanei</i>	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Lt. fischeri</i>	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Lt. firmatoi</i>	X		X	X	X			X						X	
<i>Lt. correalmiai</i>															
<i>Lt. alphabeticata</i>		X		X				X						X	
<i>Lt. shannoni</i>			X	X											X
<i>Lt. borgmeieri</i>				X			X								
<i>B. nitzalescui</i>	X	X	X	X	X		X	X						X	

a) Capturas realizadas en noviembre/99 y enero/00 en cada localidad

En los meses de noviembre/99 y enero/00 se realizó una noche de captura, en cada una de las 15 localidades escogidas para el estudio y en cada uno de los meses, con trampas CDC. El número de trampas que se utilizó en cada noche fue de seis.

En noviembre/99 la temperatura máxima osciló entre los 18,2 a 29,8°C y la mínima entre los 7,4 a 17,8°C. La precipitación fue muy baja, sumando durante todo el mes 43,1 mm de lluvia. La media de la humedad relativa del aire en el mes de noviembre fue de 60,4%. En enero/00 la temperatura máxima estuvo entre los 27,4 a 32,6 °C y la mínima entre los 16,9 a 21,7°C. Fue un período con varios días de lluvia, llegando a la marca de 228,6 mm, intercalados con los días de sol fuerte. La humedad relativa del aire fue de 71,1%.

En general se detecta un aumento del número de flebotominos/trampa en enero, así como un aumento de la riqueza específica en las localidades estudiadas durante este mes.

Los resultados de abundancia y número de flebotominos/trampa, se presentan en las tablas n° 30 y 32 (noviembre) y 31 y 33 (enero).

Tabla n° 30 – Abundancia de flebotominos capturados en noviembre/99 en las distintas localidades del municipio de Quito

Especie	Abundancia (%) - Localidad																Total
	C.Silva	Consolidora	Cooper	Janeiro	Kennedy	Mandassia	N.Horizonte	Pinhal	Portugal	S.Ines	S.José	S.Lucia	Sacchet	Venturin	Zamignan	Total	
<i>Lt. neivai</i>	100	-	54,2	34,5	-	-	-	-	50	-	67	20	-	-	-	2,2	33,1
<i>Lt. migonei</i>	-	100	33,3	41,4	60	-	-	-	-	-	33	40	-	60	20	20	35,6
<i>Lt. lanei</i>	-	-	2,8	5,2	-	-	-	-	-	-	-	20	-	20	44,5	13,3	13,3
<i>Lt. fischeri</i>	-	-	1,4	10,3	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,9	5,4	5,4
<i>Lt. firmatoi</i>	-	-	2,7	1,7	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,4	3	3
<i>Lt. correalimai</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lt. alphabeticata</i>	-	-	2,7	5,2	-	-	-	-	50	-	-	-	-	20	2,2	3,5	3,5
<i>Lt. shannoni</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lt. borgmeieri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. nitulescui</i>	-	-	2,7	-	20	-	100	-	-	-	-	20	-	-	-	17,8	5,9

Tabla n° 31 – Abundancia de flebotominos capturados en enero/99 en las distintas localidades del municipio de Quito

Especie	Abundancia (%) - Localidad																Total
	C.Silva	Consolidadora	Cooper	Janeiro	Kennedy	Mandassia	N.Horizonte	Pinhal	Portugal	S.Ines	S.José	S.Lucia	Sacchet	Venturin	Zamignan	Total	
<i>Lt. neivai</i>	8,3	52	63	60	19	25	-	16,6	48,7	67	33	5,5	73,4	53	2,5	41,9	
<i>Lt. migonei</i>	8,3	37	27	30	67,2	41,7	86	66,7	37,8	16	50	71	13,3	42	44,9	39,1	
<i>Lt. lanei</i>	66,7	3,7	-	7,1	5,2	25	14	16,6	2,7	-	-	11	13,3	5,9	18,1	9,2	
<i>Lt. fischeri</i>	-	-	-	0,3	5,2	-	-	-	-	-	1,7	9	-	-	23,1	4,5	
<i>Lt. firmatoi</i>	-	-	-	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6	
<i>Lt. correalimai</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Lt. alphabeticata</i>	-	3,7	-	5	-	-	-	-	5,4	16	-	3,6	-	-	5	2,5	
<i>Lt. shannoni</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Lt. borgmeieri</i>	-	-	-	-	-	8,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	
<i>B. nitulescui</i>	16,7	3,7	-	-	3,4	-	-	-	5,4	-	-	-	-	-	6,4	2,4	

b) Capturas realizadas de octubre/99 a febrero/00

Como se mencionó anteriormente, se escogieron las localidades de Janeiro y Zamignan para hacer un estudio secuencial de flebotominos, con una periodicidad quincenal y poder así observar su estacionalidad.

En primer lugar, se expresan los resultados globales obtenidos durante este periodo, haciendo referencia a la abundancia y al número de flebotominos/trampa. La mayor abundancia la han ido alternando *Lu. neivai* y *Lu. migonei*, la primera en cuatro y la segunda en cinco de las nueve fechas de captura (tabla nº 34). El número de ejemplares capturados fue aumentando a lo largo del estudio, siendo al final del primer periodo de captura cuando se alcanzaron los mayores números, con 39,3 y 36,2 ejemplares/trampa en principios de enero y febrero, respectivamente (tabla nº 35).

Tabla n° 34 – Abundancia de *Nebotominos* capturados en las localidades de Janeiro y Zamignan en el seguimiento de octubre/99 a febrero/00

Especie	Abundancia (%)										Total
	14a16/10/99	27a29/10/99	11a13/11/99	25a27/11/99	08a10/12/99	28a30/12/99	12a14/01/99	26a28/01/00	09a11/02/00		
<i>Lx. neival</i>	44,5	3,6	18,4	21,8	41,8	51,8	50,2	16,5	20,4	32,9	
<i>Lx. migonei</i>	38,9	60	39,5	51,5	31,6	38,8	30,3	58,9	64,9	46,1	
<i>Lx. lamel</i>	16,6	10,9	21	11,3	8,9	5,6	9,3	1,2	5,2	8,6	
<i>Lx. fischeri</i>	-	20	8	6,4	2,5	2,5	5,5	10,6	7,1	6,4	
<i>Lx. firmatol</i>	-	-	2,6	5,6	5,1	-	0,4	-	0,3	1,6	
<i>Lx. correalmal</i>	-	-	-	0,7	-	-	-	-	-	0,07	
<i>Lx. alphabeticca</i>	-	3,6	2,6	1,4	7,6	0,6	2,6	9,4	1,9	2,7	
<i>Lx. shannoni</i>	-	-	0,8	0,7	1,3	-	-	1,2	-	0,3	
<i>Lx. borgmeieri</i>	-	-	-	-	-	-	0,3	-	0,3	0,1	
<i>B. nitzulescui</i>	-	1,8	7	0,7	1,3	0,6	1,3	2,3	-	1,3	

Tabla n° 35 – Número de *Nebotominos*/trampa capturados en las localidades de Janeiro y Zamignan en el seguimiento de octubre/99 a febrero/00

Especie	N° <i>Nebotominos</i> /trampa										Total
	14a16/10/99	27a29/10/99	11a13/11/99	25a27/11/99	08a10/12/99	28a30/12/99	12a14/01/99	26a28/01/00	09a11/02/00		
<i>Lx. neival</i>	0,8	0,2	2,1	3,1	3,3	8,3	19,7	1,4	7,5	47,1	
<i>Lx. migonei</i>	0,7	3,3	4,5	7,3	2,5	6,2	11,9	50	23,8	66	
<i>Lx. lamel</i>	0,3	0,6	2,4	1,6	0,7	0,9	3,6	0,1	1,9	12,3	
<i>Lx. fischeri</i>	-	11	0,9	0,9	0,2	0,4	2,1	0,9	2,6	9,1	
<i>Lx. firmatol</i>	-	-	0,3	0,8	0,4	-	0,4	-	0,1	2,1	
<i>Lx. correalmal</i>	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	0,1	
<i>Lx. alphabeticca</i>	-	0,2	0,3	0,2	0,6	0,1	1	0,8	0,7	3,9	
<i>Lx. shannoni</i>	-	-	0,1	0,1	0,1	-	-	0,1	-	0,4	
<i>Lx. borgmeieri</i>	-	-	-	-	-	-	0,1	-	0,1	0,2	
<i>B. nitzulescui</i>	-	0,1	0,8	0,1	0,1	0,1	0,5	0,2	-	1,9	
Total	1,8	5,5	11,4	14,2	7,9	1,6	39,3	8,5	36,2	143,1	

V.4.3. Fenología

V.4.3.1. Porcentaje de machos

Los estudios fenológicos llevados a cabo sobre los flebotominos en este estudio, están basados en el cálculo del número de flebotominos/trampa de una referida especie y el porcentaje de machos que se presentan en los distintos periodos de estudio. El porcentaje de machos encontrados a lo largo del periodo puede ayudar a la hora de establecer la existencia o no de sincronización en las sucesivas generaciones de flebotominos y, en caso de existir, su número. Ello es debido a que éstos emergen más precozmente que las hembras.

a) *Lu. neivai* (figura nº 30) - Esta especie presenta un ligero incremento desde el principio de las capturas, en el mes de octubre, hasta principios de diciembre, para ascender bruscamente y obtener un pico a mediados de enero. El porcentaje de machos se mantiene superior al 50% a lo largo del estudio, a excepción de finales de noviembre en que sufre un descenso importante.

El global de los resultados de esta especie es, fundamentalmente, reflejo de las capturas realizadas en Janeiro (Ja) (figura nº 31). En Zamignan (Za), el número de flebotominos capturados ha sido siempre inferior (figura nº 32), observándose un aumento poblacional en las últimas capturas.

Figura n° 30 – N° flebotominos y porcentaje de machos de *Lu. neivai* capturados en Janeiro y Zamignan

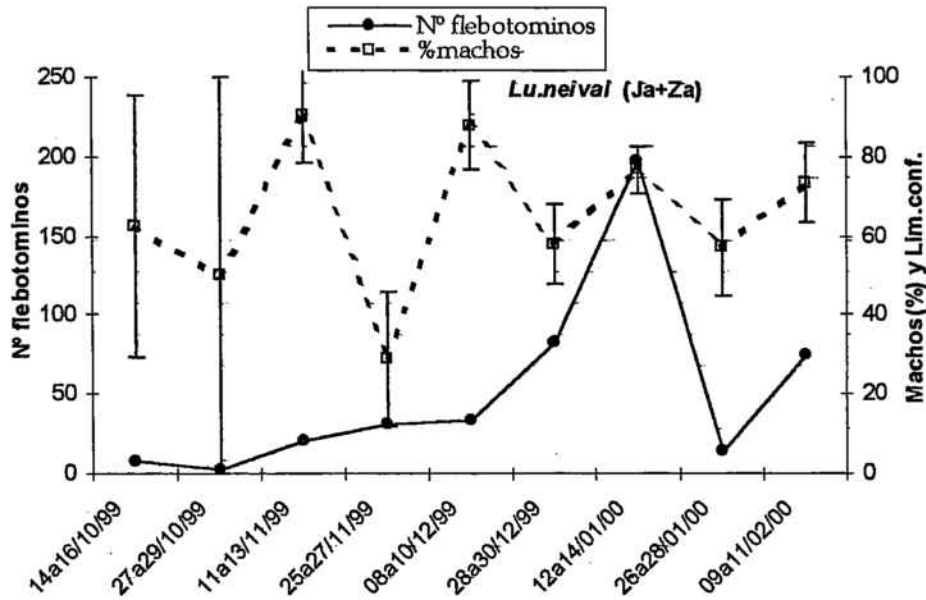
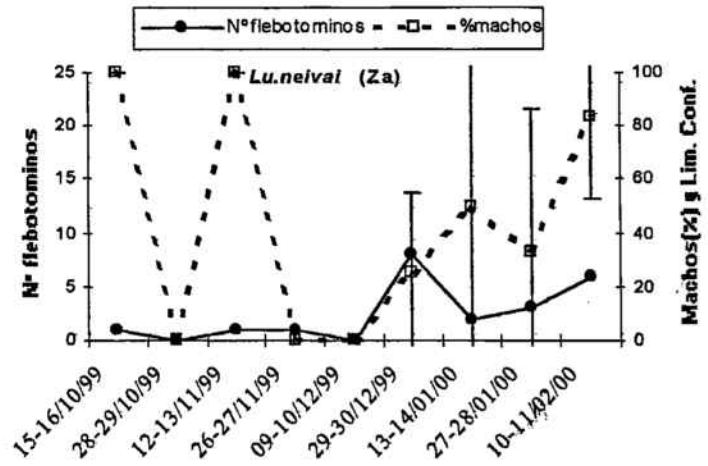
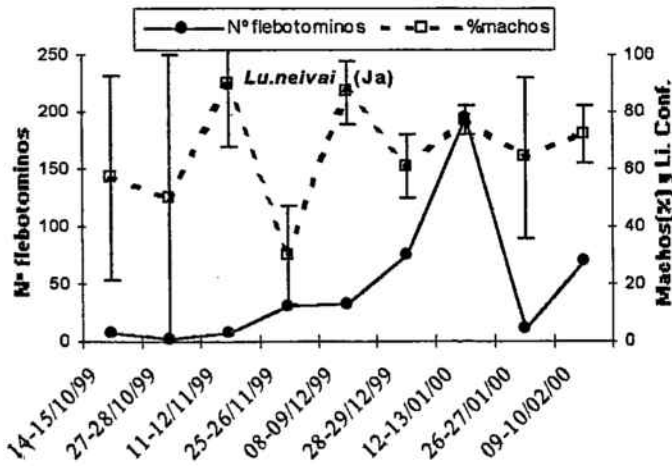


Figura n° 31 - N° de flebotominos y porcentaje machos de *Lu. neivai* capturados en Janeiro

Figura n° 32 - N° de flebotominos y porcentaje de machos de *Lu. neivai* capturados en Zamignan



b) *Lu. migonei* (figura n° 33) - Esta especie presenta un incremento progresivo desde octubre hasta febrero, en que alcanza el pico poblacional, con pequeños descensos a principios de diciembre y finales de enero. El porcentaje de machos se mantiene superior al 50% con ligeras fluctuaciones. La fenología global está influenciada por la obtenida en Janeiro (figura n° 34).

Figura n° 33 – N° flebotominos y porcentaje de machos de *Lu. migonei* capturados en Janeiro y Zamignan

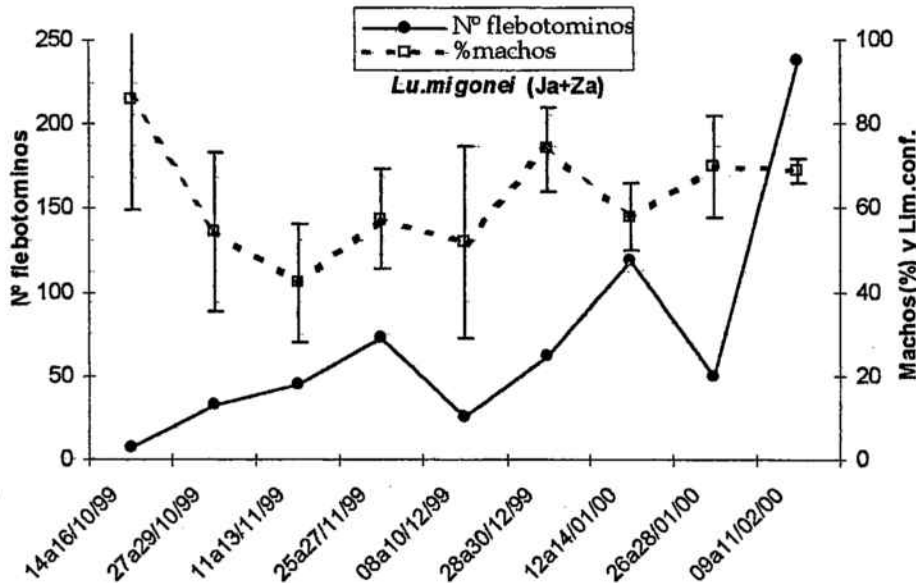


Figura n° 34 - N° flebotominos y porcentaje machos de *Lu. migonei* capturados en Janeiro

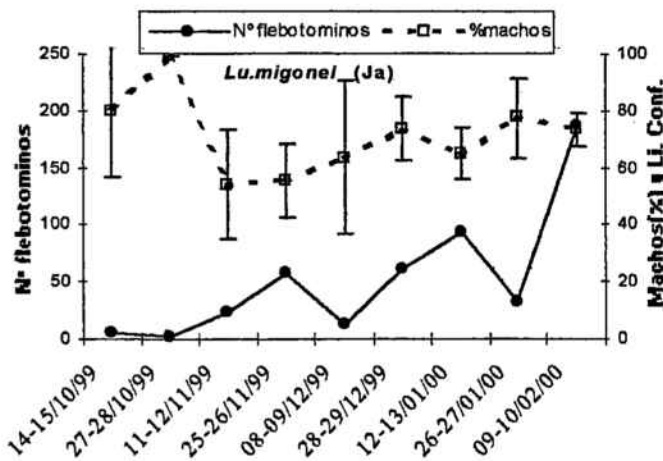
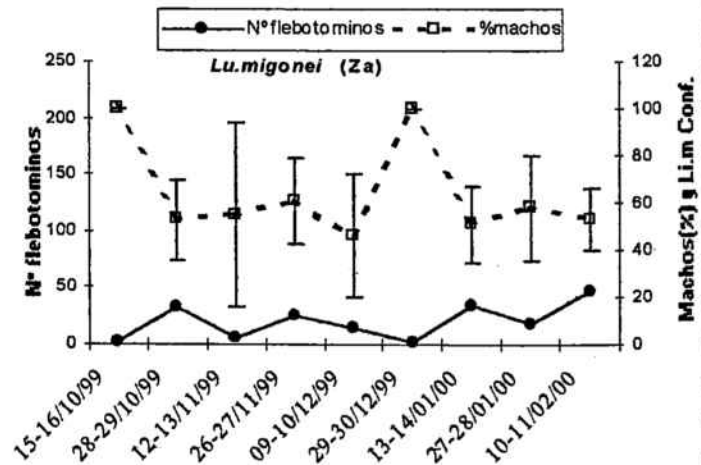


Figura n° 35 - N° de flebotominos y porcentaje de machos de *Lu. migonei* capturados en Zamignan



V.4.3.2. Estudio de las hembras

De las dos especies más abundantes (*Lu. neivai* y *Lu. migonei*) obtenidas en las localidades de Janeiro y Zamignan, se cuantificó el porcentaje de hembras con sangre y/o grávidas en relación al número de hembras capturadas. Con ello, junto al conocimiento del porcentaje de machos, se pretende averiguar la existencia de sucesivos ciclos fenológicos en las poblaciones de flebotominos estudiados.

a) *Lu. neivai* (figura n° 36) – Las hembras grávidas o con sangre de esta especie se encuentran a lo largo de todo el estudio, presentando fluctuaciones, si bien el porcentaje mayor se observa al final de enero coincidiendo con un descenso brusco de la población. En la localidad de Janeiro aparecen prácticamente durante todo el periodo de capturas (figura n° 37) mientras que en Zamignan seguramente debido al bajo número de ejemplares hembra capturados, solo se detectan a partir de finales de diciembre, en todo caso, en ningún momento se observan diferencias estadísticamente significativas ($\chi^2=7,52$; 7 g.l.; $p>0,05$) (figura n° 38).

b) *Lu. migonei* (figura n° 39) – La presencia de hembras grávidas y/o con sangre se detecta a lo largo de todo el estudio, con porcentajes más elevados en las primeras y últimas capturas, observándose la misma tendencia en las dos localidades estudiadas. Tampoco se observan diferencias estadísticas significativas ($\chi^2=10,15$; 8 g.l.; $p>0,05$) (figuras n° 40 y 41).

Figura n° 36 – N° de hembras y porcentaje de hembras grávidas, o con sangre, de *Lu. neivai*, capturadas en Janeiro y Zamignan

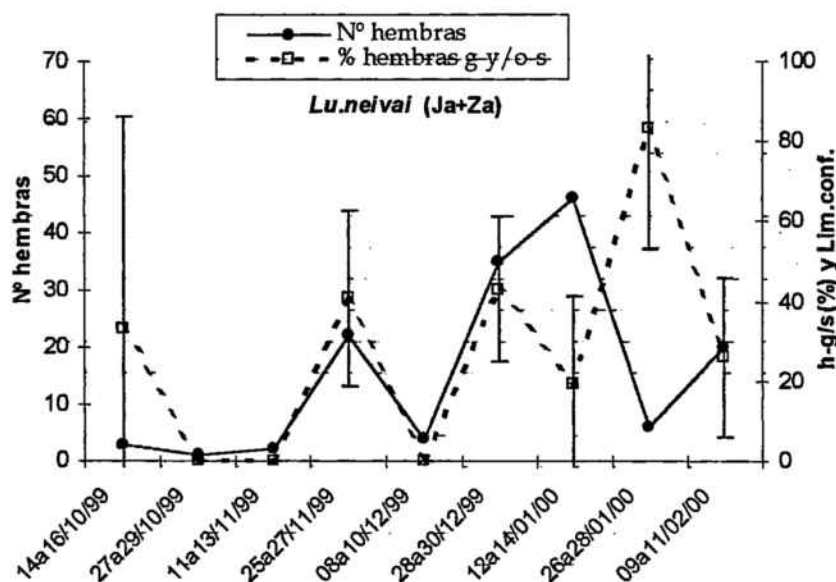


Figura n° 37 – N° de hembras y porcentaje de hembras grávidas, o con sangre, de *Lu. neivai* capturadas en Janeiro

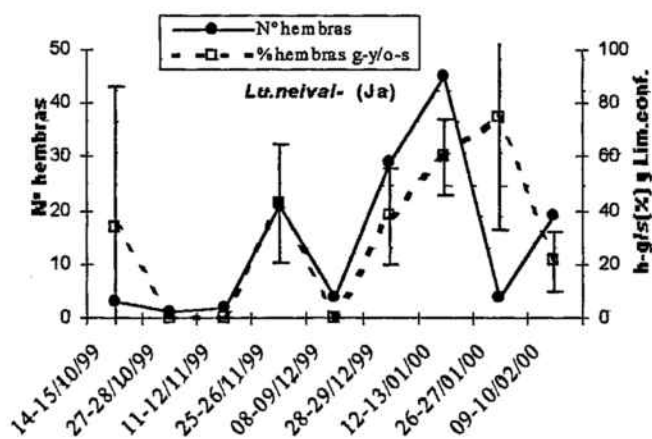


Figura n° 38 – N° de hembras y porcentaje de hembras grávidas, o con sangre, de *Lu. neivai* capturadas en Zamignan

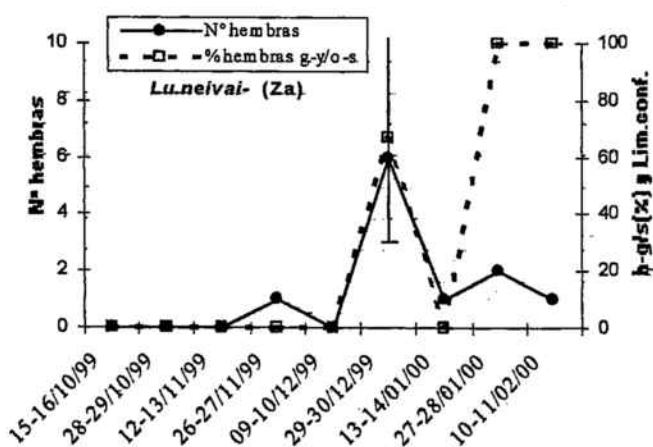


Figura n° 39 – N° de hembras y porcentaje de hembras grávidas, o con sangre, de *Lu. migonei* capturados en Janeiro y Zamignan

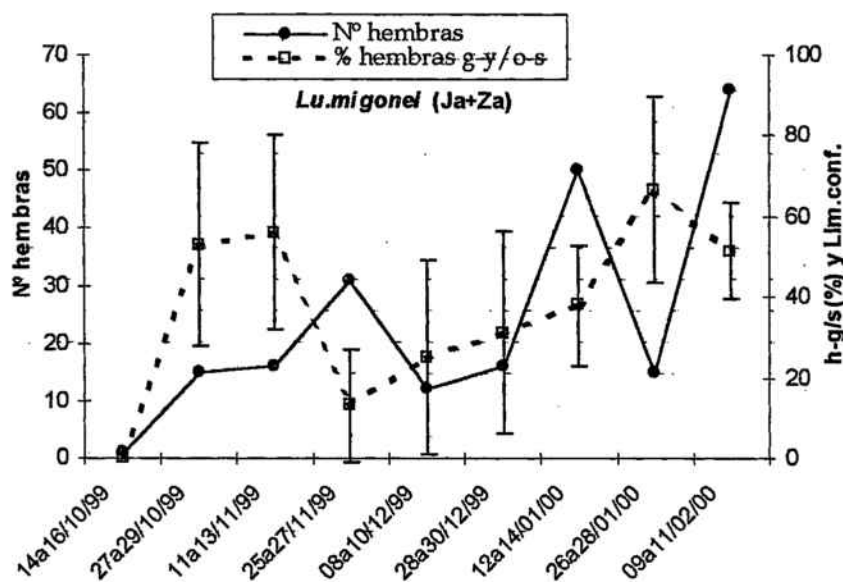


Figura n° 40 – N° de hembras y porcentaje de hembras grávidas, o con sangre, de *Lu. migonei* capturadas en Janeiro

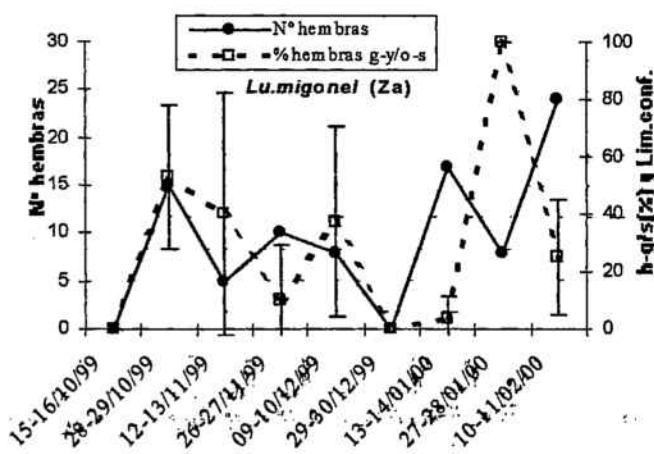
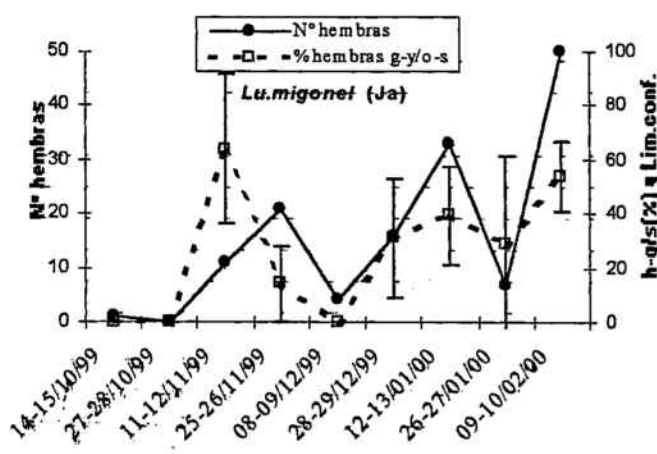


Figura n° 41 – N° de hembras y porcentaje de hembras grávidas, o con sangre, de *Lu. migonei* capturadas en Zamignan



V.4.3.3. Estudio del ciclo nictemeral

Para conocer los horarios de mayor actividad de los flebotominos, se realizaron tres noches de captura, cambiando de trampa (CDC) a cada hora. La primera trampa se colocó a las 20h (horario del crepúsculo). Todas las capturas fueron realizadas en la localidad de Janeiro, en que se observó un mayor rendimiento.

El primer ciclo fue realizado la noche del 30-31/01/00. La temperatura media osciló entre 27,6 y 20,4°C. El segundo ciclo fue en la noche del 5-6/02/00 cuya temperatura varió entre los 20,6 y 16,6°C. El tercer ciclo se hizo en la noche del 10-11/02/00 en un biotopo donde la noche anterior se habían capturado 233 flebotominos en una única trampa. La temperatura media estuvo entre los 20,7 y 25,6°C. La distribución de las especies de cada uno de los ciclos queda reflejada en las tablas n° 36, 37 y 38, respectivamente. En las figuras n° 42, 43 y 44 se representan los resultados obtenidos en los referidos ciclos y las temperaturas máxima, mínima y media correspondiente a cada uno de ellos.

Tabla n° 36 - Distribución de las especies, número de ejemplares y horarios de captura en el ciclo nictemeral 1

Hora	Especie	N°		Total
		Machos	Hembras	
20-21	<i>Lu. neivai</i>	1	0	3
	<i>Lu. migonei</i>	2	0	2
21-22	<i>Lu. neivai</i>	2	1	3
	<i>Lu. migonei</i>	6	4	10
	<i>Lu. lanei</i>	2	0	2
22-23	<i>Lu. migonei</i>	0	1	1
	<i>Lu. lanei</i>	1	1	2
23-24	<i>Lu. migonei</i>	2	0	2
	<i>Lu. fischeri</i>	0	1	1
	<i>Lu. alphabetica</i>	1	0	1
24-01	<i>Lu. neivai</i>	1	0	1
	<i>Lu. migonei</i>	0	2	2
	<i>Lu. alphabetica</i>	0	1	1
01-02	<i>Lu. neivai</i>	1	0	1
	<i>Lu. lanei</i>	1	0	1
	<i>Lu. alphabetica</i>	1	0	1
02-03		-	-	-
03-04	<i>Lu. neivai</i>	1	1	2
	<i>Lu. migonei</i>	1	1	2
04-05	<i>Lu. lanei</i>	1	0	1

Tabla n° 37 - Distribución de las especies, número de ejemplares y horarios de captura en el ciclo nictemeral 2

Hora	Especie	N°		Total
		Machos	Hembras	
20-21	<i>Lu. migonei</i>	3	1	4
21-22	<i>Lu. neivai</i>	0	1	1
	<i>Lu. migonei</i>	3	1	4
22-23	<i>Lu. neivai</i>	1	0	1
	<i>Lu. fischeri</i>	0	1	1
	<i>Lu. alphabetica</i>	0	1	1
23-24	<i>Lu. neivai</i>	2	1	3
	<i>Lu. migonei</i>	1	0	1
	<i>Lu. lanei</i>	2	0	2
24-01	<i>Lu. migonei</i>	0	4	4
01-02	<i>Lu. migonei</i>	4	0	4
02-03		-	-	-
03-04	<i>Lu. migonei</i>	1	1	2

Tabla n° 38 - Distribución de las especies, número de ejemplares y horarios de captura en el ciclo nictemeral 3

Hora	Especie	N°		Total
		Machos	Hembras	
20-21		-	-	-
21-22	<i>Lu. migonei</i>	2	0	2
22-23	<i>Lu. neivai</i>	1	0	1
	<i>Lu. migonei</i>	1	0	1
23-24	<i>Lu. migonei</i>	2	1	3
	<i>Lu. alphabetica</i>	0	1	1
24-01	<i>Lu. migonei</i>	0	1	1
01-02	<i>Lu. migonei</i>	1	0	1

Capturas de flebotominos y temperaturas máxima, mínima y media detectada durante los tres ciclos nocturnales

Figura nº 42 - Ciclo nocturno 1, noche de 30-31/01/00: Capturas y temperatura

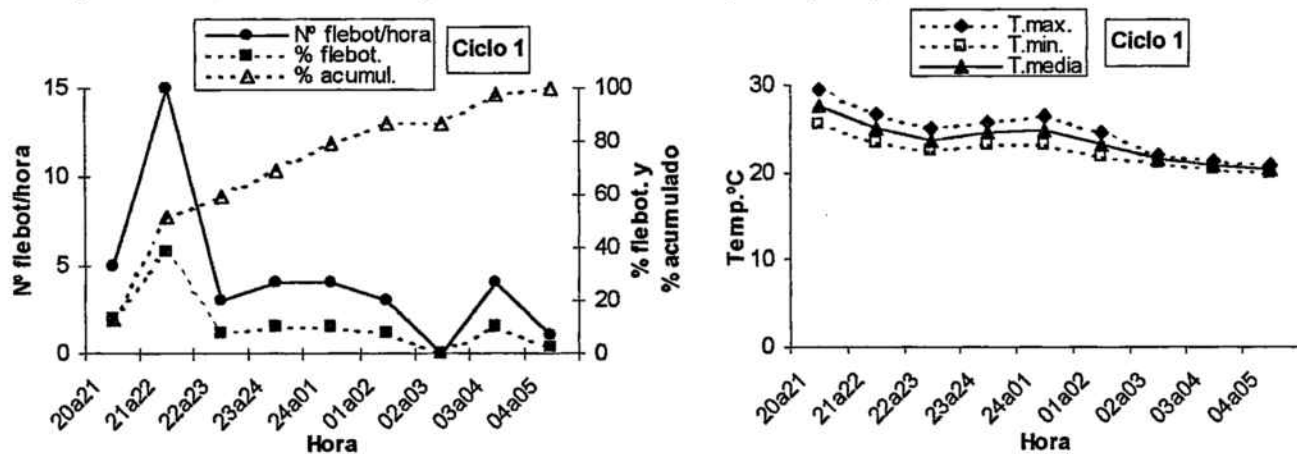


Figura nº 43 - Ciclo nocturno 2, noche del 05-06/02/00: Capturas y temperatura

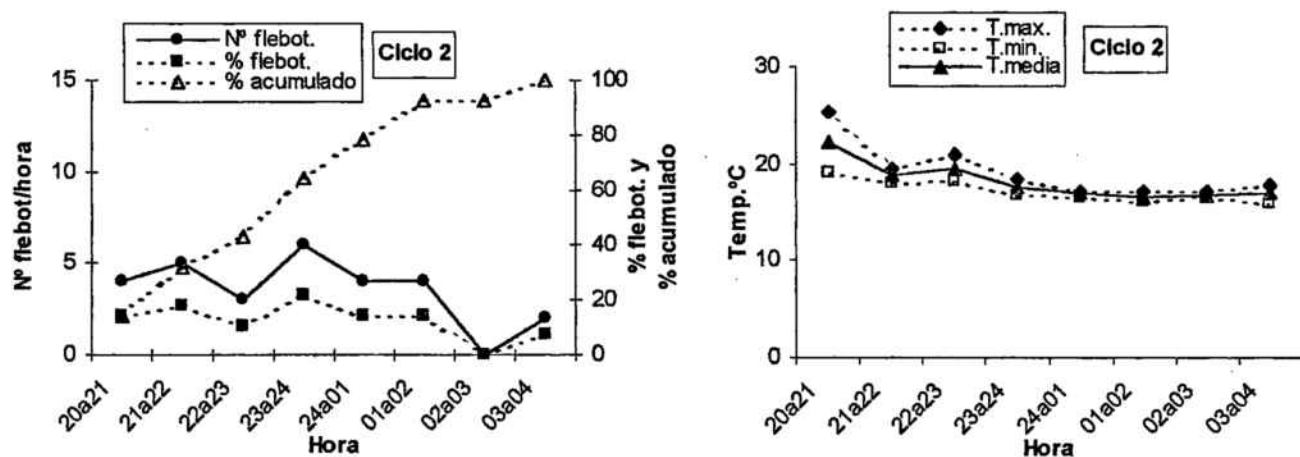


Figura nº 44 - Ciclo nocturno 3 - noche del 10-11/02/00: Capturas y temperatura

